

María del Carmen Molina Cobos

ISOLECTINAS CON ACTIVIDAD ARGINASA:
UNA PRUEBA EXPERIMENTAL SOBRE EL PARASITISMO
ATENUADO EN EL LIQUEN *Xanthoria parietina*



* 5309539192 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

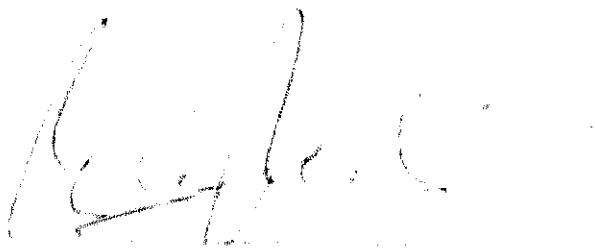
Directores: Prof. Dr. Carlos Vicente Córdoba
Catedrático de Fisiología Vegetal
Dpto. Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal)

Prof. Dr. Enriqueta Muñiz Hernando
Profesora Titular de Biología Celular
Dpto. Biología Celular

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Biológicas
1995

Trabajo realizado en la Cátedra de Fisiología Vegetal y el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense, que presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, Mayo 1995

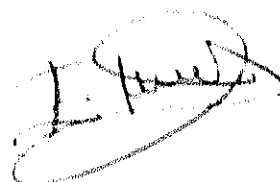


Fdo. María del Carmen Molina Cobos

Conformes los directores de la Tesis



Fdo: Prof. Dr. Carlos Vicente



Prof. Dra. Enriqueta Muñiz

Dijo Dios: "produzca la tierra vegetación: hierbas que den semillas y árboles frutales que den fruto sobre la tierra, según su especie", y así fue. La tierra produjo vegetación: hierbas que dan semilla y árboles que dan fruto con la semilla dentro, según su especie; y vio Dios que era bueno. Y atardeció y amaneció, día tercero.

Génesis, 1: 11-13

A mi sobrino Alberto, por su sonrisa,
alegría y vitalidad y porque ya me llama
"tita".

A mis padres, por su espíritu de sacrificio
y abnegación.

A Jose Alberto, por su amistad y generosidad
sin límite.

A ellos, con todo el amor y respeto de que
soy capaz.

La realización de esta tesis doctoral es el resultado del esfuerzo, trabajo e interés de muchas personas a las que deseo expresar mi agradecimiento.

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis, el Profesor Dr. Carlos Vicente, sus continuos desvelos e interés, su entusiasmo, sus geniales ideas y planteamientos y sobre todo, su paciencia. El es mi MAESTRO y amigo, de quien he aprendido todo cuanto sé a nivel profesional y de quién espero seguir aprendiendo. Gracias por confiar en mí y permitirme trabajar contigo. Gracias jefe.

Mi más sincero agradecimiento a la Prof. Dra. María Estrella Legaz su interés y colaboración estrecha en la realización de este trabajo fundamentalmente en la parte analítica del mismo. Ella me ha enseñado la importancia de la paciencia, la constancia y el rigor en el trabajo de laboratorio.

Quiero agradecer a la Prof. Dra. Enriqueta Muñiz, codirectora de esta memoria doctoral la confianza que depositó en mí ya en los primeros años de mi carrera. Esa confianza siempre me impulso a buscar una meta y tratar de alcanzarla. Gracias por tus interesantes consejos.

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Vegetal I (Catedrá de Fisiología Vegetal) y el Departamento de Biología Celular. Quiero agradecer a los directores de ambos departamentos, el Prof. Dr. Carlos Vicente y el Prof. Dr. Agustín Zapata, respectivamente, permitirme hacer uso de la infraestructura y material necesarios para la realización de este trabajo.

La Dr. Carmen Ascaso y su equipo científico, del Dpto de Biología Vegetal del C.S.I.C. y la Dr. Maite Solas del Dpto. de Biología Celular de la Facultad de Biología (UCM) colaboraron en los estudios ultraestructurales realizados, así como la Dr. Rosalía Rodríguez del Dpto de Bioquímica de la Facultad de Biología (UCM) en el análisis de aminoácidos. A ellas, mi más sincero agradecimiento.

Quiero recodar al Prof. Lauro Xavier Filho por su amable cesión de bioskin, utilizado en esta tesis, así como al Prof. Dr. Roman Türk y la Dra. Elfie Stocker-Wörgötten del Institut für Pflanzenphysiologie de la Universidad de Salzburgo donde realicé el trabajo de cultivo *in vitro* de biontes que se expone en esta memoria. Vaya para ellos mi reconocimiento más sincero.

Gracias también a la Dr. Luisa Martín, Dr. Adolfo Avalos y Dra. Elena Pérez-Urria quienes pusieron a mi entera disposición su equipo informático.

Por supuesto, debo recordar a todos mis compañeros y amigos con los que he trabajado durante estos años. Todos ellos han colaborado de alguna manera a la realización de esta tésis.

Gracias a Silvia por sus consejos, disponibilidad y sentido del humor; a Merche, que tantas veces resolvió mis dudas sobre HPLC; a José Luis que, sin duda, recuerda el "día que nos conocimos", gracias Jose, por tu interés personal y la ayuda diaria; a mi María "enfermi mala" por su amistad y su esfuerzo en los momentos de agobio; a Teresa, por la paz y tranquilidad que siempre ofrece; a Lourdes, mi compañera de fatigas en esto de la escritura de un trabajo científico. Quiero recordar también a Khalid, Abdel Aziz y Najat mis nuevos compañeros, a Lolita, Margarita, Maritza y especialmente al Prof. Dr. Roberto de Armas por su interés permanente y su apreciable ayuda, así como a Raquel y Ana del Dpto. de Biología Celular. Mis más sincero agradecimiento a Raquel por su ayuda técnica inestimable y su carácter siempre afable.

Quisiera hacer una mención especial a Aurelio, mi compañero y amigo de tantos años. Gracias por su interés y colaboración en todo momento, especialmente en la realización de las electroforesis. Gracias también a Marisa y a Elena por su amistad y en general, a todos mis amigos del Departamento de Genética incluyendo a todos los profesores titulares y ayudantes, especialmente a la Dr. Pilar Arana que me permitió hacer uso de su microscopio.

Quiero hacer presente a mi familia, especialmente a mis padres, a quienes debo todo cuanto soy, lo cual incluye también mis logros profesionales.

A todos mis amigos, gracias por seguir siendolo, sobre todo en los momentos difíciles.

A Jose que tantas veces ha sacrificado su tiempo por ayudarme, tal como está haciendo en este momento. Gracias Jose por estar siempre ahí.

Gracias a todos los que en algún momento me han tenido en sus oraciones o, en su defecto, han deseado para mí lo mejor.

Por tantas bendiciones, no puedo por menos, dar gracias a Dios que nunca levantó su mano de mi cabeza.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
1.- LA SIMBIOSIS COMO MUTUALISMO.....	2
1.1.- Estudios ecofisiológicos.....	2
1.2.- Estudios morfológicos y estructurales.....	3
2.- SISTEMAS DE REGULACION EN SIMBIOSIS.....	7
2.1.- Síntesis de compuestos secundarios.....	7
2.2.- Regulación de la síntesis y transporte de fotosintetizados.....	8
2.3.- Síntesis de poliaminas y su regulación....	10
2.4.- Control sobre el fotobionte mediante el desarrollo de haustorios.....	12
2.5.- Regulación de la población del fotobionte.	14
3.- FOTOBIONTES COMPATIBLES E INCOMPATIBLES.....	15
3.1.- Pruebas derivadas de los estudios de resíntesis.....	16
3.2.- Lectinas de líquenes. ¿Proteínas para el reconocimiento de fotobiontes compatibles?	18
4.- EL PAPEL DE LAS LECTINAS EN LA ASOCIACION <i>Rhizobium</i> -LEGUMINOSAS Y OTRAS SIMBIOSIS.....	20
4.1.- <i>Rhizobium</i> -leguminosas.....	20
4.2.- Otras simbiosis.....	22
5.- ¿ESTAN RELACIONADAS LAS LECTINAS CON MECANISMOS PARASITARIOS? ¿Y CON MECANISMOS DE DEFENSA?.....	23
5.1.- Mecanismos parasitarios.....	23
5.2.- Mecanismos de defensa.....	24
OBJETIVOS.....	27
MATERIAL Y METODOS.....	28
1.- MATERIAL BIOLOGICO.....	30
2.- PURIFICACION PARCIAL DE LA LECTINA INTRATALINA...	30
2.1.- Extracto libre de células.....	30
2.2.- Precipitación con sulfato de amonio.....	30
2.3.- Filtración por gel de Sephadex G-150.....	31
3.- CARACTERIZACION PARCIAL DE LA LECTINA.....	31
3.1.- Medida de actividad arginasa	31

3.2.- Ensayo de azúcares totales.....	32
4.- MARCAJE DE LA PROTEINA PARCIALMENTE PURIFICADA...	33
4.1.- Marcaje con fluorescencia.....	33
4.2.- Marcaje con ferritina.....	33
4.3.- Valoración de actividad arginasa en lectinas marcadas.....	34
5.- CURVA DE ACTIVIDAD UREASA EN PARED DEL FOTOBIONTE.....	34
5.1.- Aislamiento de los fotobiontes.....	34
5.2.- Inducción de ureasa.....	34
5.3.- Aislamiento de paredes celulares.....	35
5.4.- Valoración de actividad ureasa.....	35
5.5.- Efecto de la parietina sobre la actividad ureasa en pared.....	36
5.5.1.- Extracción y purificación.....	36
5.5.2.- Valoración de actividad ureasa paredes.....	36
5.5.3.- Valoración de la concentración de parietina por HPLC.....	37
6.- LIGAMIENTO DE LA LECTINA INTRATALINA DEL MICOBIONTE.....	38
6.1.- Ensayo de ligamiento a paredes del fotobionte.....	38
6.1.1.- Actividad enzimática de la lectina y su receptor.....	38
6.2.- Ensayo de ligamiento a fotobiontes usando lectina marcada.....	38
6.2.1.- Microscopía de fluorescencia.....	39
6.2.2.- Microscopía electrónica de transmisión.....	40
6.3.- Ensayo de ligamiento en fotobiontes con lectina no marcada. Citoaglutinación.....	41
6.4.- Ensayo de ligamiento a eritrocitos. Hemaglutinación.....	42
7.- ABSORCION DE ARGININA EXTRACELULAR.....	42
7.1.- Extracto libre de células.....	42
7.2.- Valoración de arginina.....	43
8.- ANALISIS DE LA LECTINA INTRATALINA POR HPLC DE EXCLUSION MOLECULAR.....	43
8.1.- Unión lectina-receptor de pared por HPLC..	43
8.1.1.- Condiciones de análisis.....	44
8.2.- Lectina marcada con fluoresceína o ferritina analizada por HPLC.....	45

9.- LOCALIZACION CITOQUIMICA POR MICROSCOPIA DE	
UREASA EN PAREDES DEL FOTOBIONTE.....	45
9.1.- Unión lectina-receptor de pared. Detección	
citoquímica por TEM.....	45
9.1.1.- Reacción citoquímica de ureasa....	46
9.1.2.- Microscopía electrónica de	
transmisión.....	46
10.- ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE <i>Xanthoria parietina</i> .	47
10.1.- Tratamiento previo.....	47
10.1.1.- Microscopía electrónica de	
transmisión.....	48
10.1.2.- Análisis microbiológico.....	48
10.2.- Alteraciones ultraestructurales en	
fotobiontes aislados.....	48
10.2.1.- Microscopía electrónica de	
transmisión.....	48
10.2.2.- Microscopía electrónica de	
barrido.....	49
11.- PURIFICACION TOTAL DE LAS ISOFORMAS DE ARGINASA.	50
11.1.- Purificación arginasa intracelular (ABP) ..	50
11.2.- Purificación arginasa segregable (SA)....	51
11.2.1.- Determinación del máximo de	
secreción.....	51
11.2.2.- Método de purificación.....	51
11.2.3.- Ensayo de azúcares totales.....	51
	52
12.- CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE AMBAS ISOFORMAS...	52
12.1.- Electroforesis en poliacrilamida:	
determinación del peso molecular.....	53
12.2.- Electroforesis capilar:	
análisis del punto isoeléctrico.....	53
12.3.- Análisis de aminoácidos.....	55
12.4.- Análisis de azúcares del resto	
glicosídico por HPLC.....	56
12.4.1.- Hidrólisis ácida y extracción	
de azúcares.....	56
12.4.2.- Purificación de patrones.....	57
12.4.3.- Condiciones de análisis.....	57
12.5. Espectros de fluorescencia.....	58
13.- AFINIDAD ENTRE LAS LECTINAS Y EL RECEPTOR UREASA.	59
13.1.- Análisis de afinidad por fluorimetría....	59
13.2.- Análisis de afinidad por microscopía de	
fluorescencia.....	60

14.- ANALISIS DE POLIAMINAS EN FOTOBIONTES.....	60
14.1.- Tratamientos previos en el fotobionte....	61
14.2.- Extracción de poliaminas.....	61
14.3.- Derivatización de las poliaminas.....	62
14.4.- Análisis de poliaminas por HPLC.....	63
15.- ANALISIS DE CLOROFILAS.....	66
15.1.- Extracción de clorofilas endógenas.....	66
15.2.- Análisis por HPLC.....	66
16.- ENSAYOS DE LIGAMIENTO ISOLECTINA-RECEPTOR.....	70
16.1.- Unión isoelectinas a eritrocitos.	70
Hemaglutinación.....	
16.2.- Unión isoelectinas-receptor. Valoración de actividad ureasa en pared.....	70
16.3.- Unión isoelectina-receptor de fotobionte. Observación microscópica.....	71
16.4.- Valoración de actividad glucanasa intracelular.....	71
16.5.- Efecto de la putrescina sobre la actividad glucanasa.....	72
16.5.1.- Actividad glucanasa de un preparado comercial.....	72
16.5.2.- Actividad glucanasa intracelular.....	72
17.- METODO DE AISLAMIENTO Y CULTIVO IN VITRO DEL FOTOBIONTE.....	72
17.1.- Preparación del medio de cultivo.....	73
17.2.- Preparación del extracto de suelo.....	73
17.3.- Aislamiento del fotobionte.....	73
17.4.- Aislamiento del micobionte.....	74
18.- ESTUDIO MORFOLOGICO DE LOS CULTIVOS.....	74
19.- ENSAYO DE LIGAMIENTO DE ISOLECTINAS EN CULTIVOS.....	75
19.1.- Tratamiento previo y observación microscópica.....	75
19.2.- Unión isoelectinas-receptor. Detección enzimática.....	76
20.- TRATAMIENTOS ESTADISTICOS.....	76
RESULTADOS.....	77
I.- LECTINA INTRATALINA Y SU RECEPTOR DE PARED.....	77

1.- PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LA LECTINA INTRATALINA.....	78
2.- DETERMINACION DE ACTIVIDAD UREASA EN PARED CELULAR DEL FOTOBIONTE.....	78
2.1.- Efecto de la parietina.....	78
3.- LIGAMIENTO DE LA LECTINA INTRATALINA.....	81
3.1.- Ensayos enzimáticos de ligamiento en fotobiontes y paredes celulares.....	81
3.2.- Ensayos de ligamiento en fotobiontes con lectina marcada.....	83
3.2.1.- Unión de lectina fluorescente y fotobiontes.....	85
3.2.2.- Lectina marcada con ferritina a fotobiontes.....	88
3.2.3.- Ligamiento de fotobiontes con lectina no marcada. Citoaglutinación y pérdida de las condiciones fotoenergéticas	90
3.2.4.- Detección citoquímica de ureasa en pared e inhibición por unión con lectina.....	92
3.2.5.- Determinación de la unión lectina-paredes con actividad ureasa.....	94
4.- MODIFICACIONES ULTRAESTRUCTURALES.....	96
4.1.- Análisis del mantenimiento de la simbiosis.....	96
4.2.- Análisis tras incubar los fotobiontes en urea 100 mM durante 4h.....	98
II. PURIFICACION Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA.....	100
1.- PURIFICACION PROTEICA.....	100
1.1.- Purificación arginasa intratalina....	158
1.2.- Purificación arginasa segregable....	160
2.- CARACTERIZACION PROTEICA.....	162
2.1.- Determinación del punto isoelectrico.	162
2.2.- Determinación de la composición de aminoácidos.....	162
2.3.- Determinación del peso molecular.....	164
2.4.- Determinación los monosacáridos del resto glicosídico.....	164
2.5.- Espectros de fluorescencia.....	167

3.- INTERACCION ENTRE AMBAS LECTINAS Y EL RECEPTOR UREASA.....	137
3.1.- Análisis de afinidad por fluorimetría.....	168
3.2.- Análisis de afinidad por microscopía de fluorescencia.....	168
3.3.- Análisis de poliaminas libres y conjugadas.....	173
3.4.- Análisis de clorofilas endógenas.....	175
3.5.- Ensayos de ligamiento isoelectina-receptor.....	175
3.6.- Efecto de la unión sobre la actividad enzimática de pared.....	176
3.7.- Efecto de la putrescina y urea sobre la actividad glucanasa.....	177
III. ESTUDIOS DEL AUTOBIONTE EN CULTIVO AXENICO.....	233
1.- ESTUDIO MORFOLOGICO Y ENZIMATICO DE FOTOBIOTES EN CULTIVO.....	233
2.- ESTUDIOS DE LIGAMIENTO CON ISOLECTINAS MARCADAS EN CULTIVOS APOSIMBIOTES.....	236
DISCUSION.....	261
CONCLUSIONES	285
TEORIA.....	288
BIBLIOGRAFIA.....	291

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.-	Fotografía del líquen <i>Xanthoria parietina</i>	30
Figura 2.-	Gradiente de flujo y concentración en el análisis de poliaminas por HPLC.....	64
Figura 3.-	Gradiente de flujo y concentración en el análisis de clorofilas por HPLC.....	68
Figura 4.-	Diagrama de filtración de lectina.....	100
Figura 5.-	Diagrama de filtración de lectina, estimación de monosacáridos.....	102
Figura 6.-	Velocidad de reacción y actividad específica de ureasa en pared.....	104
Figura 7.-	Espectro de absorbancia de parietina.....	106
Figura 8.-	Purificación de parietina.....	108
Figura 9.-	Efecto de la parietina sobre la ureasa.....	110
Tabla 1.-	Actividad enzimática de lectina y receptor....	82
Figura 10.-	Diagrama de filtración de lectina marcada.....	112
Tabla 2.-	Efecto del marcaje en la actividad arginasa...	84
Figura 11.-	Fotomicrografía de fluorescencia. Lectina marcada con fluoresceína.....	114
Tabla 3.-	Análisis cuantitativo de la unión de lectina fluorescente a fotobiontes de <i>X. parietina</i>	87
Tabla 4.-	Análisis cuantitativo de viabilidad celular...	89
Figura 12.-	Distribución de frecuencias de tamaño celular.	116
Figura 13.-	Localización ultraestructural de lectina marcada con ferritina por TEM.....	118
Figura 14.-	Absorción de arginina por fotobiontes.....	120
Figura 15.-	Crecimiento y valoración de clorofilas en fotobiontes.....	122
Figura 16.-	Actividad fitoaglutinante de la lectina.....	124
Figura 17.-	Actividad eritroaglutinante de la lectina.....	126
Figura 18.-	Detección citoquímica de ureasa por TEM.....	128
Tabla 5.-	Análisis cuantitativo de fotobiontes con ureasa en pared.....	93
Figura 19.-	Cromatografía de lectina por HPLC.....	130
Figura 20.-	Cromatografía de lectina fluorescente por HPLC	132
Figura 21.-	Cromatografía de lectina marcada con ferritina por HPLC.....	134
Figura 22.-	Talos no tratados de <i>X. parietina</i> por TEM.....	136
Figura 23.-	Talos no tratados (detalle) por TEM.....	138
Figura 24.-	Talos incubados en arginina 28 mM por TEM.....	140
Figura 25.-	Talos incubados en urea 100 mM, 2h por TEM....	142
Figura 26.-	Talos incubados en urea (detalle) por TEM.....	144
Figura 27.-	Talos incubados en arginina 28 mM, urea 100mM, 2h y lectina por TEM.....	146
Figura 28.-	Talos incubados en arginina 28 mM y lectina por TEM.....	148
Figura 29.-	Talos incubados en arginina 28 mM y lectina	

(visión general) por TEM.....	150
Figura 30.- Algas incubadas en urea 100 mM, 4h por SEM....	152
Figura 31.- Algas incubadas en urea 100 mM, 4h por TEM....	154
Figura 32.- Algas incubadas en tampón PBS, 4h por TEM.....	156
Figura 33.- Diagrama de desorción de ABP.....	179
Figura 34.- Filtración de ABP a través de hidroxapatita..	181
Tabla 6.- Purificación de ABP.....	189
Figura 35.- Actividad arginasa segregable.....	183
Figura 36.- Diagrama de desorción de SA.....	185
Figura 37.- Filtración de SA a través de hidroxapatita...	188
Tabla 7.- Purificación de SA.....	161
Figura 38.- Electroferograma de ABP y SA. Recta patrón....	190
Figura 39.- Electroforesis en PAGE al 12%.....	192
Tabla 8.- Análisis de aminoácidos ABP y SA.....	163
Figura 40.- Diagrama de elución de monosacaridos patrón...	194
Figura 41.- Elución de galactosa por HPLC.....	196
Figura 42.- Elución de glucosa por HPLC.....	198
Tabla 9.- Tiempos de retención de azúcares por HPLC.....	166
Figura 43.- Elución de ABP hidrolizada por HPLC.....	200
Figura 44.- Elución de SA hidrolizada por HPLC.....	202
Figura 45.- Recta de calibrado en HPLC para azúcares.....	204
Figura 46.- Espectro de fluorescencia de ABP y SA.....	206
Figura 47.- Espectro de absorbancia y fluorescencia de fluoresceína.....	208
Tabla 10.- Porcentaje de fluorescencia amarilla tras desplazamiento de ABP y SA.....	169
Figura 48.- Fotomicrografía de fluorescencia. ABP marcada con fluoresceína.....	210
Tabla 11.- Porcentaje y número de fotobiontes con ABP o SA fluorescente unida a su pared.....	160
Tabla 12.- Análisis estadístico (datos Tabla 11).....	172
Figura 49.- Recta de calibrado en HPLC para poliaminas....	212
Figura 50.- Cuantificación de poliaminas (Fracción S).....	214
Figura 51.- Cuantificación de poliaminas (Fracción PH)....	216
Figura 52.- Cuantificación de poliaminas (Fracción SH)....	218
Figura 53.- Cromatografía de clorofilas endógenas.....	220
Figura 54.- Actividad aglutinante de ABP y SA.....	222
Figura 55.- Actividad ureasa del receptor en fotobiontes aislados. Unión de isolectinas....	224
Figura 56.- Microscopía óptica. Efecto de la entrada de ABP en fotobiontes.....	226
Figura 57.- Microscopía óptica. Efecto de la entrada de SA en fotobiontes.....	228
Figura 58.- Actividad glucanasa intracelular.....	230
Figura 59.- Efecto de la putrescina sobre glucanasa.....	232
Figura 60.- Microscopía óptica del micobionte.....	238
Figura 61.- Microscopía óptica del fotobionte (color).....	240

Figura 62.-	Microscopía óptica del fotobionte.....	242
Figura 63.-	Diferentes estados del desarrollo de trebouxoides en cultivo. M. óptica.....	244
Figura 64.-	Microscopía óptica. División celular.....	246
Figura 65.-	Actividad ureasa del receptor de trebouxoides en cultivo. Unión de isoelectinas.....	248
Figura 66.-	Microscopía óptica. Incorporación de SA a trebouxoides.....	250
Figura 67.-	Microscopía óptica. Incorporación de SA en células con distintos grados de desarrollo....	252
Figura 68.-	Microscopía óptica. Daños drásticos.....	254
Figura 69.-	Microscopía óptica. Interacción SA-receptor...	256
Figura 70.-	Microscopía óptica. Detalle de la estructura..	258
Figura 71.-	Microscopía óptica. Mantenimiento de la estructura en células con distinto grado de desarrollo.....	259
Tabla 13.-	Porcentaje de las distintas fluorescencias observadas en trebouxoides en cultivo.....	237

ABREVIATURAS

ABP	Arginasa intratalina
Ala	Alanina
Asx	Acido aspartico + asparagina
BBM	Medio basal de Bold
CMC	Carboximetilcelulosa
Cys	Cisteina
d.i.	Diámetro interno
Glx	Acido glutámico + glutamina
Gly	Glicocola
His	Histidina
HPLC	Cromatografía Líquida de alta resolución
Ile	Isoleucina
LRM	Medio basal de Lilly y Barnett
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
Phe	Fenilalanina
pI	Punto isoeléctrico
pm	Peso molecular
PCA	Acido perclórico
PBS	Tampón fosfato salino
Pro	Prolina
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
Ser	Serina
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
Thr	Treonina
Tris	Tri-hidroximetil-aminometano
Tryp	Triptófano
Tyr	Tirosina
UAFE	Unidades de absorbancia a fondo de escala
UV	Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

En 1887, de Bary acuñó el término simbiosis que definió como *„des Zusammenlebens ungleichnamiger organismen „*, "organismos diferentes que viven estrechamente unidos... De Bary incluía dentro del término tanto las asociaciones mutualistas (en las cuales los organismos implicados se beneficiaban mutuamente de la asociación) como las parasíticas (en las cuales uno de los organismos se beneficiaba en detrimento de los otros miembros de la simbiosis). Aunque con posterioridad algunos líquenólogos han utilizado como sinónimo simbiosis y mutualismo, nosotros preferimos mantener el significado inicial del término, tal como sugieren algunos autores (Lewis, 1973; Stanier *et al.*, 1977), dado que el concepto de simbiosis no es discutible en las asociaciones líquénicas, pero la naturaleza mutualista o parasitaria del sistema ha sido y es objeto de controversia (Kappen, 1994).

Los líquenes fueron descritos por primera vez como asociación simbiótica en 1867 por Schwendener (citado por Galun, 1989); hasta entonces habían sido considerados como plantas diferentes de las algas y los hongos. Desde que fueron descritos el pasado siglo hasta el momento actual, la definición de "líquen" ha sido modificada en numerosas ocasiones (Hawkworth, 1988) así como la naturaleza mutualista o parasitaria de tal asociación (ver revisión Galun, 1989). Una de las últimas definiciones ha sido propuesta por Hawkworth (1992), describiendo la asociación como:

"Un estado mutualista, obligado ecológicamente, entre un exohabitante formado por un hongo (micobionte) y una población endohabitante localizada extracelularmente constituida por algas unicelulares o filamentosas o por células cianobacteriales (fotobionte) "

La referencia a una perspectiva ecofisiológica sugiere que la función y adaptación de la simbiosis líquénica pueden ser consecuencia de las condiciones ambientales a las cuales el holobionte ha estado sometido. Este concepto concuerda con las teorías coevolutivas de Ahmadjian (1987), puesto que los líquenes han soportado desde su origen, antes de la separación del continente Gondwana (Sheard, 1977), las mismas presiones selectivas como asociación, además de la microselección natural propia del sistema.

Sin embargo, esta definición incurre, desde nuestro punto de vista, en errores o, cuando menos, en una cierta ambigüedad de concepto. Primero, porque muchos líquenes están formados por ambos fotobiontes, cianobacterias y algas (Smith, 1927). Segundo, porque no considera la presencia de xenohabitantes, tales como bacterias, que pudieran tener un papel antimicrobiano o evolutivo en la asociación (Zook, 1983). Y por último, porque sin lugar a dudas, considerar los líquenes como asociaciones mutualistas es una aseveración injustificada y discutible.

1.- LA SIMBIOSIS COMO MUTUALISMO

El mutualismo en líquenes, en sentido estricto, lleva implícito el comportamiento ecofisiológico sinérgico de los componentes del holobionte en beneficio de los simbiontes. Sin embargo, con frecuencia es difícil establecer ese comportamiento, observándose tendencias antagónicas tales como el parasitismo del micobionte, o procesos que podrían interpretarse como mecanismos de defensa-ataque.

El concepto mutualista de la simbiosis líquénica se apoya fundamentalmente en los estudios ecofisiológicos y en las observaciones de la morfología y ultraestructura del holobionte.

1.1. Estudios ecofisiológicos

Algunos autores consideran que el éxito biológico de ambos biontes incrementa en estado simbiótico (Lewis, 1987; Smith y Douglas, 1987), permitiéndoles incluso sobrevivir cientos de años en hábitat extremos tales como la Antártica (Beschel, 1955). Sin embargo, una visión antropocéntrica de las observaciones no siempre permite dar una interpretación correcta a los resultados puesto que las condiciones fluctuantes de humedad, así como la carencia de nutrientes, no son situaciones adversas para la simbiosis, sino más bien condiciones necesarias para el establecimiento y mantenimiento de la misma (Ahmadjian, 1962; Stocker-Wörgötten, 1987).

Por otra parte, cabe plantearse si, en estas condiciones "extremas", es una ventaja para el fotobionte vivir en simbiosis. Al menos desde el punto de vista general y atendiendo igualmente a observaciones ecológicas, no hay evidencia de ello. Muchas cianobacterias y algas de vida libre también están presentes en los ambientes extremos donde viven los líquenes (Friedman *et al.*, 1988) e incluso algunas microalgas tienen una distribución similar a sus homólogas liquenizadas (Broady *et al.*, 1987).

Smith y Douglas (1987) interpretan la simbiosis como un sistema mutualista considerando al micobionte como el huésped y al fotobionte como al simbionte, sugiriendo que el micobionte envuelve al endosimbionte jugando un papel protector. Argumentan su teoría asegurando que el micobionte mantiene y regula un óptimo de hidratación que permite al fotobionte realizar la fotosíntesis. Existe un óptimo de hidratación por debajo y por encima del cual disminuye la actividad fotosintética, dada la necesidad de agua para la fotosíntesis, y porque al incrementar la presión hídrica, aumenta la resistencia a la difusión de dióxido de carbono (Snelgar *et al.*, 1981). Ante la pregunta de cómo es posible que las algas liquenizadas puedan continuar fotosintetizando en condiciones de sequedad, en las que las algas no liquenizadas son incapaces de fotosintetizar (Brock, 1975), aquellos autores consideran que las algas en simbiosis se encuentran incluidas dentro de la estructura talina que controla y mantiene la humedad ambiental dado que el hongo es capaz de captar y almacenar el agua aunque esto sólo ocurre a bajas intensidades de luz (Green y Lange, 1991). Sin embargo, las algas verdes de vida libre también son altamente hidrofílicas (Bertsch, 1966) y, por otra parte, no hay evidencias de que el agua almacenada por el hongo pueda cederse y ser utilizada por las algas (Lange *et al.*, 1990). Por otra parte, Vicente *et al.*, 1988, descubrieron un mecanismo activo de regulación hídrica en talos de *Evernia prunastri*, por disminución de la superficie evapotranspirante. Los poros corticales reducen su superficie en paralelo con la pérdida de agua, con lo cual se establece un sistema de conservación de volumen que implica una tendencia a la esfericidad. De esta forma, el talo hidratado presenta el máximo valor de área y el deshidratado el mínimo para un valor de volumen casi constante. Este mecanismo de

cierre de poros, de disminución de área evapotranspirante es dependiente de energía fotosintética y, por tanto, del metabolismo del alga. Ante la implicación de ambos biontes en el sistema con comportamientos aparentemente sincrónicos, sería difícil establecer si se trata de un proceso mutualista o de un fenómeno de coadaptación ante situaciones medio-ambientales de estrés hídrico.

Con respecto a la movilidad de los nutrientes, entre los simbiontes, es bien conocida la transferencia de fotosintetizados del fotobionte al micobionte. Las algas verdes transfieren fundamentalmente distintos tipos de polialcoholes dependiendo del género del fotobionte, mientras que las cianobacterias excretan al medio glucosa (Galun, 1987). En algunas especies líquénicas, tales como *Cylindrocapsa convoluta*, más del 90% del carbono fijado en fotosíntesis es transferido al micobionte en breve espacio de tiempo (Smith y Douglas, 1987). Las algas pueden liberar también otras sustancias, tales como vitaminas o micronutrientes necesarias para el desarrollo del micobionte.

En relación a la movilidad de sustancias del hongo al autosimbionte, no hay evidencias de que exista un paso de nutrientes directo. Parece ser que los requerimientos nutricionales del alga quedan satisfechos con los minerales que arrastra el agua de lluvia. En este sentido, Smith en 1962, remarcó la capacidad del hongo para absorber iones minerales. Estos iones no se liberan en condiciones normales, aunque pueden ser devueltos al medio durante un corto período de tiempo, cuando los talos se rehidratan muy rápidamente. Sin embargo, no existe evidencia alguna de que estos iones sean captados por el fotobionte, pudiéndose explicar como un fenómeno dependiente de la presión osmótica sin implicaciones fisiológicas. En cualquier caso, no debemos olvidar que existe un transporte desde el hongo liquenizado al alga de sustancias tales como ácidos fenólicos, poliaminas, etc, cuyo papel en la simbiosis, según los diferentes autores, será expuesto posteriormente.

Los biontes autótrofos necesitan la luz para llevar a cabo la fotosíntesis; sin embargo, altas intensidades de luz pueden conducir a la pérdida de las condiciones fotoenergéticas. Büdel (1990) sugiere que el engrosamiento del cortex superior en el líquen *Peltula* puede ser un mecanismo de protección

por parte del hongo. Sin embargo, existen otras cianobacterias de vida libre que viven en las mismas condiciones que las liquenizadas y que carecen de esta supuesta protección. En realidad, parece que las cianobacterias tienen su propio mecanismo de control, realizando la fotosíntesis sólo a primera hora de la mañana y reduciendo su actividad frente a altas intensidades de luz (Wessels y Kappen, 1993). Los fenóles, sustancias sintetizadas fundamentalmente por el hongo, cristalizan en el cortex superior por lo que también se ha postulado que pueden actuar como pantalla protectora (Rundel, 1978), aunque recientemente se ha descrito fotoinhibición en líquenes que presentaban esta supuesta pantalla (Demming-Adams *et al.*, 1990). Por otra parte, una elevada producción de ácido úsnico fue observada por Ahmadjian y Jacobs (1985) en resistesis líquénica a bajas intensidades de luz. Por tanto, el papel protector de los fenóles quedaría reducido a la luz ultravioleta puesto que tienen un máximo de absorción entre 270-290 nm (Pedrosa y Legaz, 1991a). Además, la síntesis de fenóles y su movilidad están reguladas por fitocromo (Mateos *et al.*, 1993). Aunque el movimiento de fenóles se lleva a cabo preferentemente hacia el cortex, parte de ellos quedan retenidos sobre las paredes del fotobionte (Ahmadjian y Jacobs, 1985; Honegger, 1986; Avalos y Vicente, 1987) e incluso penetrar en el interior del alga (Avalos y Vicente, 1987). Aún esta entrada, es regulada por fitocromo, ya que el fotorreceptor activa una adenilato ciclasa algal (Segovia y Vicente, 1994) cuyo producto facilita la permeación de los fenóles. Por tanto, la síntesis de fenóles no puede considerarse en sí misma como un mecanismo de protección del hongo hacia el alga.

En relación con el requerimiento de dióxido de carbono por parte del alga para llevar a cabo la fotosíntesis, se ha demostrado que en talos altamente hidratados la difusión de dióxido de carbono se reduce de forma que el carbono incorporado por el alga procede en un 70% del producto de la respiración del micobionte medular (Snelgar and Green, 1981). Sin embargo, el micobionte no incrementa el aporte de dióxido de carbono hacia el fotobionte en estas situaciones extremas (Kappen, 1994).

1.2. Estudios morfológicos y estructurales

Algunos autores consideran que la estructura de los líquenes con estratificación interna (heterómeros) es el resultado de un proceso mutualista entre el exohabitante y el endohabitante. El hongo se asocia con una población de algas que deben mantener su capacidad fotosintética de forma que el hongo esté obligado a asegurar una adecuada iluminación, facilitar el intercambio gaseoso, etc. Honegger (1990) postula que las presiones selectivas habrían conseguido que el micobionte se dispusiera en una estructura tridimensional adecuada como soporte de las algas, en la que éstas podrían llevar a cabo los procesos de crecimiento, mantenimiento y control. Sin embargo, esta autora considera que las simbiosis no estratificadas, fundamentalmente líquenes crustáceos (homómeros), que incluyen a la mayoría de los líquenes, pueden ser consideradas como sistemas simbiotes primitivos en los cuales el hongo se comporta como un parásito frente al fotobionte (Honegger, 1991). En relación con esto, algunos autores consideran que la disposición de las algas en talos heterómeros puede ser el resultado de un mecanismo directamente dependiente del fotobionte. Molina y Vicente (1994), describen el fototropismo positivo de una población de *Trebouxia* en el líquen *Ulsnea aurantia-coaxata* de tal forma que las algas son capaces de moverse del talo al apotecio dependiendo de si la luz incide directamente sobre una u otra estructura del líquen. Este fototropismo positivo bien podría interpretarse como relicto del pasado de vida libre de los autobiontes. Aunque la estructura tridimensional del talo depende fundamentalmente del hongo, no está claro que mecanismos determinan este proceso aunque parece que el fotobionte está directamente implicado en ellos. Las observaciones de Stocker-Wörgötter y Türk (1991) parecen confirmar esta teoría. Sin embargo, hasta el momento no han sido descritos los mecanismos que regulan la estratificación de los talos heterómeros y la disposición de los fotobiontes en capas o agregados. Por tanto, las conclusiones que afirman el mutualismo de los líquenes argumentando sobre estas observaciones deben ser tomadas con cautela.

Ante las evidencias expuestas, resulta difícil asegurar la naturaleza mutualista de la simbiosis en líquenes. El hongo no puede ser considerado el huésped, como sugieren Smith y Douglas (1987), dado que en las simbiosis vegetales dicho huésped es el donador de carbohidratos, en el caso de los líquenes, el fotobionte. Considerar al micobionte como huésped por el hecho de constituir el mayor porcentaje de la biomasa del líquen (en *X. parietina* el 47% está constituido por el micobionte frente al 7% del fotobionte), tampoco es una razón de peso, puesto que, son muchos los ejemplos de la naturaleza en los que el huésped es más pequeño que el parásito.

La naturaleza parasitaria o hemiparasitaria del holobionte parece tomar cuerpo ante las pocas evidencias claras de mutualismo. Esta hipótesis se apoya, además, en los numerosos trabajos publicados en relación con los procesos de regulación entre los biontes.

2.- SISTEMAS DE REGULACION EN SIMBIONTES

La existencia de hongos parásitos que posteriormente pueden liquenizarse así como el comportamiento parasitario de algunos líquenes, tales como *Glyphopeltis*, han hecho sospechar una "vocación" parasitaria del micobionte en simbiosis (Ott y Scheidegger, 1992). Sin embargo, las evidencias más claras de este comportamiento se obtienen al analizar los diferentes mecanismos de regulación entre los simbiosiontes.

2.1. Síntesis de compuestos secundarios

Los fenoles son compuestos aromáticos formados por dos o tres anillos fenólicos enlazados por oxidaciones y uniones ésteres. Algunos son sustancias propias de los líquenes (Elix y Whitton, 1984), aunque ciertos hongos no liquenizados producen compuestos similares (Culberson, 1969). El papel protector de los fenoles frente a altas intensidades de luz ha sido discutido anteriormente. Sin embargo, los fenoles parecen tener capacidad herbicida y antimicrobiana (Rundel, 1978; Vartia, 1973) cuyo papel

ha sido interpretado como protector frente a depredadores e infecciones bacterianas. En este sentido, es interesante destacar que los fenoles pueden ser incorporados al interior del alga produciendo fenómenos ficocidas (Avalos y Vicente, 1987). En relación con esto, Culberson y Ahmadjian (1980) postularon un mecanismo de defensa por parte del fotobionte. Muchos productos liquénicos, tales como dépsidos, depsidonas, etc. proceden de un ácido fenólico común, el ácido orselínico. En hongos no liquenizados, estos precursores originan compuestos altamente ficocidas, tales como quinonas que proceden de la descarboxilación del ácido fenólico. Parece ser que, en los cloroliquenes, las algas inhiben tal descarboxilación desviando la ruta hacia la producción de compuestos menos tóxicos que se acumulan en la superficie de las paredes del alga y el hongo. La naturaleza del inhibidor no está descrita pero se postula que sería una molécula pequeña que competiría con el ácido orselínico por el centro activo de la descarboxilasa. En este sentido, Kinraide y Ahmadjian, (1970) proponen que el ácido úsnico podría ser un producto "de desecho" del precursor tóxico.

Por otra parte, algunos fenoles, tales como el ácido barbático, sólo se forman en estados de resíntesis o en el líquen natural (*Cladonia cristatella*), pero no en cultivos aislados del micobionte, independientemente de los nutrientes disponibles en el medio de cultivo, lo que demuestra la implicación del fotobionte en tal proceso (Honegger y Jutasi, 1990).

2.2. Regulación de la síntesis y transporte de fotosintetizados

Los compuestos liquénicos influyen en la permeabilidad de los fotobiontes y afectan a la regulación enzimática de forma que se establece un complejo control resultado de la relación entre los carbohidratos sintetizados por el fotobionte y los fenoles producidos por el micobionte.

La L-arginina es un aminoácido que puede acumularse libre en el talo de muchas especies liquénicas (Legaz *et al.*, 1982), así como almacenado en vacuolas en algunas células fúngicas (Weiss y David, 1977). Este aminoácido puede ser hidrolizado por diferentes isoformas de arginasa (Legaz y

Vicente, 1983, Planelles y Legaz, 1987, Pedrosa y Legaz, 1995) para producir L-ornitina y urea o descarboxilado por una arginasa sintetizada fundamentalmente por el fotobionte, para producir agmatina (Vicente y Legaz, 1981), la cual es más tarde hidrolizada produciendo putrescina y urea (Vicente y Legaz, 1982). Los talos que contienen algas verdes como fotobionte producen ureasa inducida por urea (Shapiro, 1977; Vicente *et al.*, 1983) así como por rehidratación del talo, posiblemente como resultado de la movilización de urea cristalizada en el mismo (Rodríguez y Vicente, 1991), si bien el contenido hídrico de los talos y la secreción de ureasa no está clara (Pérez-Urría *et al.*, 1993). La urea es hidrolizada por ureasa, rindiendo amonio y dióxido de carbono. La actividad de esta enzima tiene dos vías de regulación fundamentales. Un exceso del aminoácido induce un represor de ureasa el cual ha sido caracterizado en *Evernia prunastri* descrito como una proteína de 167 kDa (Pérez-Urría *et al.*, 1989) y en *Pseudoevernia furfuracea* como una proteína de 720 kDa formada por cuatro monómeros de 87 kDa y cuatro monómeros de 91 kDa (Avalos *et al.*, 1985). Por otra parte, el dióxido de carbono producido por la hidrólisis de la urea puede ser utilizado en la producción de fenoles líquénicos. Cuando talos de *Evernia prunastri* se incubaron con ^{14}C -urea, aproximadamente el 50% del ^{14}C fue incorporado en el esqueleto carbonado de los fenoles (Blanco *et al.*, 1984). Estos compuestos inhiben la actividad ureasa *in vitro* al bloquear grupos tioles de la proteína (Vicente, 1985). Los fenoles son sintetizados fundamentalmente por el micobionte y secretados al medio extracelular donde cristalizan sobre las paredes de las hifas y las algas (Honegger, 1991). Por otra parte, la producción de ureasa corre a cargo fundamentalmente del alga (Mosbach, 1973). En condiciones naturales puede ocurrir inhibición de la enzima del fotobionte dado que la mayor parte se localiza en la pared y puesto que una pequeña parte de los fenoles pueden entrar dentro del fotobionte (Avalos y Vicente, 1987; Legaz y Vicente, 1989). Por tanto, el micobionte puede regular la producción de fotosintetizados. Un exceso en la concentración de carbohidratos se reflejaría en un aumento en la

concentración de fenoles, los cuales son secretados al medio, inhibiendo la actividad ureasa y regulando así la producción de dióxido de carbono y por tanto, la síntesis de compuestos carbonados.

Una prueba adicional del fuerte control del micobionte sobre el fotobionte en el síntesis de carbohidratos radica en la evidencia experimental de que los fotobiontes (tanto cianobacterias como algas verdes) únicamente segregan carbohidratos al medio, aproximadamente el 90% de los fotosintetizados, en presencia del componente fúngico. Cuando los fotobiontes eran aislados y mantenidos en cultivo, la secreción de polialcoholes disminuía con el tiempo hasta quedar reducida al 5% (Smith, 1974). En este punto, el comportamiento de los fotobiontes se asemeja al de otras algas no liquenizadas. Por tanto, cabe sospechar la existencia de un mecanismo fúngico que favorecería o activaría el transporte de polioles al micobionte. Smith y Douglas (1987) proponen que el ribitol puede ser la molécula señal que induzca al micobionte a establecer la estructura tridimensional que soporte la población de algas. Sin embargo, la adición de ribitol a los medios de cultivo no favorece esta estructuración (Ahmadjian, 1992).

2.3. Síntesis de poliaminas y su regulación

Las poliaminas (putrescina, espermidina, espermina y cadaverina) son cationes alifáticos multivalentes que tienen dos, tres o cuatro cargas positivas a pH fisiológico. El papel de estas moléculas en plantas superiores es variado. Se han relacionado con procesos de embriogénesis y morfogénesis (Santos *et al.*, 1993; Chi *et al.*, 1994), procesos de floración y diferenciación (Caffaro *et al.*, 1994; Caffaro y Vicente, 1994), maduración del fruto (Escribano y Merodio, 1994), ciclo celular de cultivos sincrónicos de ciertas algas (Kotzabasis y Senger, 1993), etc. En el alga marina *Dunaliella primolecta* se ha observado un aumento en la actividad fotosintética, concentración de clorofilas y ATP consecuencia del incremento de putrescina (Hourmant *et al.*, 1994). Sin embargo, el papel de las poliaminas en los procesos de senescencia son confusos. Las poliaminas inhiben la senescencia en

plantas superiores (Birecka *et al.*, 1991; Evans y Malmberg, 1989; Slocum *et al.*, 1984), aunque esto parece depender del origen de las poliaminas, puesto que la putrescina endógena favorecen la senescencia (Kao, 1994) mientras que la exógena, inhiben el proceso (Kao, 1993).

En algunos casos, las poliaminas se han descrito como moléculas tóxicas a determinadas concentraciones. Guarino y Cohen (1979 a,b), describen este efecto en cianobacterias observando una marcada conjugación de poliaminas a ribosomas y la disminución en la cantidad de DNA y RNA celular. David y Ristow (1989, 1991), describen un complejo mecanismo de control de la concentración de poliaminas endógenas en *Neurospora crassa*, dado que el aumento en la cantidad de putrescina inhibe el crecimiento. El conocimiento fisiológico del efecto de estas moléculas en líquenes y otras criptógamas es hasta el momento reducido. Stanislaus y Maravolo (1994) encuentran en talos de la hepática *Marchantia polymorpha* un aumento concomitante en la concentración de clorofilas y putrescina, considerando que las poliaminas actúan como radicales libres regulando procesos de oxidación (Drolet *et al.*, 1986) y uniéndose en forma catiónica (a pH fisiológico) a proteasas, regulan procesos degradativos (Kaur-Sawhney y Galston, 1986). Por otra parte, Legaz *et al.*, (1985), observan que la incubación de talos del líquen *Evernia prunastri* en putrescina aumenta la secreción de ribitol al medio por lo que estos autores suponen que la putrescina activaría la conversión de fotosintetizados a ribitol y más tarde la célula los segregaría. Dado que el micobionte es el principal productor de putrescina (Escribano y Legaz, 1988), cabe plantearse que fuera esta la molécula que activara la secreción de ribitol permitiendo así el transporte de fotosintetizados del alga al hongo. Esto explicaría que los fotobiontes aislados y en cultivo redujeran la secreción del poliol prácticamente hasta anularse (Smith, 1974).

2.4. Control sobre el fotobionte mediante el desarrollo de haustorios

Los haustorios son prolongaciones o proyecciones de las hifas del micelio fúngico que penetran o contactan estrechamente con el bionte autótrofo. Estas prolongaciones haustoriales y los apresorios han sido tradicionalmente descritas en hongos parásitos (Edward y Allen, 1970; Emmett y Parbery, 1975) y están relacionados con los procesos de patogénesis e infectividad fúngica.

En líquenes, la naturaleza del contacto parece depender de los biontes, el hábitat y la complejidad estructural del simbiote, siendo más frecuentes en ambientes secos y en líquenes homómeros (Galun y Bubrick, 1984; Honegger, 1987). Los haustorios intracelulares parecen ser propios de líquenes más primitivos (Tschermak, 1941) mientras que los intraparietales parecen ser más frecuentes en líquenes heterómeros, más evolucionados (Malachowski *et al.*, 1980). Sin embargo, en todos los casos se detectan actividades enzimáticas, ácidos grasos, poliésteres, así como productos secundarios cristalizados en la superficie de contacto de estas prolongaciones con el fotobionte (Honegger, 1986).

Sorprendentemente, las especies líquénicas que contienen algas del género *Coccomyxa* y algunas que contienen algas verdes nunca presentan prolongaciones haustoriales. Se observa un contacto entre las paredes de ambos simbioses pero no se desarrollan este tipo de uniones estrechas. Este hecho se ha correlacionado con la presencia en la pared del fotobionte de un policarotenoide altamente resistente a la descomposición de tipo enzimático inducida o provocada por el micobionte que se denomina esporopolenina y se ha interpretado como un mecanismo de defensa por parte del fotobionte (Honegger y Brunner, 1981; Brunner y Honegger, 1985). Como en otros sistemas huesped-parásito, se puede detectar entre los líquenes la tendencia evolutiva a la reducción de la virulencia en los ataques al ficobionte. La selección natural ha favorecido las líneas del hongo que no provocaban la muerte del fotobionte puesto que en estos casos, la eficacia biológica del micobionte es mayor dado que la muerte del huesped conduciría a la muerte del parásito.

En 1981, Ahmadjian y Jacobs encontraron que el micobionte era más virulento frente a sus propias algas en cultivo que en estado natural provocando penetraciones más profundas, aunque en cultivo el número de células que presentaban haustorios era menor probablemente porque el fotobionte es capaz de dividirse más rápidamente al no soportar el control directo del micobionte. En líquenes existe una alta variabilidad genética que se refleja en la velocidad de desarrollo y la heterogeneidad isozimática entre distintos clones de micobionte procedentes de distintas ascosporas (Fahselt, 1985). Esta variabilidad genética, propia de los organismos con reproducción sexual, se hace extensible al polimorfismo encontrado en relación con la virulencia en el micobionte, de forma que las líneas más virulentas han sido y son seleccionadas en contra. Esta argumentación permite interpretar cómo los líquenes menos evolucionados presentan líneas fúngicas más virulentas, es decir, con penetraciones más profundas (Tschervak, 1941), mientras que los líquenes estratificados parecen desarrollar líneas menos virulentas, donde son poco frecuentes los haustorios intracelulares. La situación de equilibrio puede romperse por diversas causas; de hecho en el líquen *Cladonia cristatella* aproximadamente el 50% de las células fotosintéticas presentan haustorios y sin embargo, tienen un aspecto sano. En contraste, al ponerse en contacto dos cultivos aislados de los biontes se observan células algales penetradas y muertas quizás porque la compatibilidad o resistencia de las algas no es permanente (Ahmadjian y Jacobs, 1981).

Aunque las funciones de los haustorios no están claras y pudieran ser diversas, parecen existir evidencias de que la función primordial de estas zonas de contacto íntimo no es la transferencia de nutrientes (Collins y Farrar, 1978) aunque Smith y Douglas (1987) elaboran una teoría que defiende la posición opuesta.

2.5. Regulación de la población del fotobionte

De acuerdo con Hill (1985) y Honegger (1991), la población de fotobiontes se multiplica más rápidamente en los márgenes del talo, permaneciendo constante en el resto del líquen. Una cuestión a resolver es si el mantenimiento del número de fotobiontes es el resultado de la longevidad de los fotobiontes establecidos o consecuencia del reciclaje de fotobiontes por división celular, es decir, si las células muertas son sustituidas por nuevas células. Los trabajos publicados en este sentido parecen confirmar la primera hipótesis. Estudios en *Parmelia caperata* (Slocum *et al.*, 1980) demostraron que durante un periodo de tiempo previamente establecido había muy pocas divisiones celulares en el fotobionte. De 184 células elegidas al azar, sólo se observó un aplanosporangio. Similares resultados se obtuvieron en otras épocas del año. Parece, por tanto evidente, que el control de la división celular del fotobionte va más allá de las presiones ambientales. Es posible que el micobionte produzca ciertos inhibidores que regulen el número y distribución de los endosimbiontes. Honegger (1987) establece que el crecimiento de los fotobiontes en zonas del talo alejadas de los márgenes se desarrolla lentamente y con dificultad y postula la existencia de algún mecanismo inhibitorio cuya base molecular se desconoce hasta el momento. En este sentido considera que los fenoles pueden estar implicados en este proceso apoyándose en observaciones ultraestructurales (Honegger, 1991). Por otra parte, esta autora, en 1984, observó como las hifas haustoriales penetran los aplanosporangios antes de la rotura de la célula madre, permitiéndole ponerse en contacto directo con las algas antes de su dispersión al azar. Esto ha sido explicado como un posible mecanismo de regulación en la distribución de los endosimbiontes en el talo.

Una característica especialmente interesante es que los fotobiontes en simbiosis líquénica han perdido su capacidad de reproducción sexual y por tanto, no existe recombinación. La única fuente de variabilidad genética ha quedado reducida a la mutación. Por tanto, podemos considerar que estas poblaciones tienen un grado de polimorfismo prácticamente nulo. Desde el punto de vista evolutivo, esto

significa que posiblemente están bien adaptadas a su endohábitat, pero su capacidad de cambiar y ocupar otra hábitat diferente del actual, es decir, el talo, es muy pequeña. Esta reducción de la sexualidad del fotobionte puede haber sido inducida o controlada por el micobionte (Kappen, 1994). El micobionte, sin embargo, al menos potencialmente, mantiene su sexualidad tal como demuestra la alta variabilidad genética observada y las diferencias de tal variabilidad entre líquenes de la misma especie sexuados y asexuados (Fashelt, 1987; Haggeman y Fashelt, 1990; Fashelt, 1991). Por otra parte, las observaciones en la naturaleza descritas por Ott (1987 a y b) donde el micobionte de *X. parietina* es capaz de capturar fotobiontes de *Physcia*, *Parmelia* y *Evernia* pudiendo formar simbiosis con *Trebouxia* y *Pseudotreboxia* demuestran su baja especificidad y la posibilidad de reproducción sexual. La presencia de tal variabilidad genética es condición indispensable para la evolución y por tanto, necesaria para adaptarse ante posibles cambios (Marincovic y Ayala, 1977).

Otra posibilidad, puesta recientemente de manifiesto, es el movimiento de material genético a través de los espacios intracelulares. La hipótesis considera a los fotobiontes simbioses obligados por modificación genética de un ancestro de vida libre, *Pleurastrum* (Ahmadjian, 1988). El análisis de DNA de clones de *Cladonia cristatella* en gradiente de cloruro de cesio revela la aparición en algunos clones de bandas de DNA semejantes a plásmidos cuyo tamaño se estima en 25,6 Kb. Estos fragmentos podrían considerarse, al menos potencialmente, factores de transformación génica de un simbionte, el alga, por el micobionte, hipotético emisor del plásmido (Ahmadjian *et al.*, 1990).

3.-FOTOBIONTES COMPATIBLES E INCOMPATIBLES

Existen una gran cantidad de datos indirectos que sostienen la idea de que los líquenes constituyen una simbiosis altamente especializada.

- De un total de 1600 especies conocidas de algas (Bold, 1973), muy pocas pueden ser fotobiontes potenciales.

- Las algas de vida libre crecen en los mismos hábitats que los líquenes e incluso encima o debajo de ellos, pero rara vez son incorporados a la simbiosis e incluso si se incorporan siempre están más desfavorecidas en la asociación que los fotobiontes (Smith, 1981).
- Los fotobiontes, especialmente *Trebouxia* y *Pseudotrebouxia*, rara vez se desarrollan en la naturaleza como algas de vida libre.
- Aproximadamente existen 34 géneros conocidos de fotobiontes y 13.000 especies de líquenes (Ahmadjian, 1982) sin embargo, del 50-70% de las asociaciones líquénicas tienen como fotobionte especies de dos géneros: *Trebouxia* y *Pseudotrebouxia*.

El reconocimiento de los simbiontes en los primeros estadios de la asociación ha sido uno de los puntos más estudiados con el fin de verificar cuál ha sido el origen de tan alta especificidad y si en los líquenes con reproducción sexual como *X. parietina* los primeros estadios son importantes para el mantenimiento de la simbiosis (Ahmadjian, 1967; Bubrick *et al.*, 1981). Los estudios se han realizado desde dos puntos de vista no necesariamente excluyentes: La resíntesis líquénica y la producción de lectinas. En ambos casos se trata de mimetizar situaciones hipotéticas de reconocimiento inicial.

3.1. Pruebas derivadas de los estudios de resíntesis

Los trabajos más importantes en este sentido han sido llevados a cabo por Ahmadjian y sus colaboradores. En 1981, Ahmadjian y Jacobs describieron los primeros momentos del contacto alga-hongo en la simbiosis líquénica. Las observaciones con microscopía electrónica de barrido revelaron como las hifas recubrían completamente los fotobiontes y las rodeaban con una matriz extracelular de origen fúngico de forma mucho más drástica de lo que se observaba en los talos naturales. Sin embargo, este comportamiento del hongo no parecía estar determinado por ningún tipo de señal procedente del fotobionte, puesto que estas escuámulas iniciales se formaban de igual manera alrededor de esferas de cristal inerte entre 10-15 mm de diámetro. Este comportamiento puede compararse al de algunos

hongos patógenos. Conidios de *Magnaporthe grisea* (Hamer *et al.*, 1988) y propágulos de *Uromyces appendiculatus* (Epstein *et al.*, 1987) son capaces de unirse fuertemente a superficies inertes tales como el teflón, polietileno, cristal, etc. Estos autores sugirieron que este tipo de uniones hidrofóbicas pueden estar implicadas en el reconocimiento del huésped en los primeros momentos del contacto.

En el caso de la resíntesis líquénica, tras el primer contacto se desarrollaban haustorios que penetraban las células del fotobionte conduciendo a la muerte de aquellas incompatibles. En este sentido, el número de haustorios encontrado en resíntesis era menor que en simbiosis natural, probablemente porque la velocidad de división era más alta y esto no facilitaba el contacto. Cuando el micobionte de *Caulonia cristatella* se puso en contacto con algas del mismo género que su fotobionte natural y con algas de distinto género e incluso con algas de vida libre, los primeros contactos se produjeron en todas pero los procesos de resíntesis posteriores sólo se llevaron a cabo con fotobiontes del mismo género que el endosimbionte; en el resto de los casos, las hifas penetraban las células hasta que provocaban la muerte del alga.

Este comportamiento hace sospechar que la diferenciación entre células compatibles e incompatibles no ocurre en los primeros estadios del contacto o están implicadas otro tipo de señales (quizás hidrofóbicas) que favorecen el contacto pero que no son específicas. Parece que la selección natural actuaría en los siguientes estadios del desarrollo tales como la morfogénesis y rediferenciación del holobionte (Ahmadjian, 1992). Por otra parte, el desarrollo de haustorios que penetran y dan muerte a las células no seleccionadas puede ser un reflejo de la virulencia no atenuada hacia fotobiontes que no han coevolucionado con el micobionte, es decir, que han sido puestos en contacto con el micobionte recientemente, tal como ocurre con otras relaciones parásito-huésped (Ahmadjian, 1987).

3.2. Lectinas de líquenes. ¿Proteínas para el reconocimiento de fotobiontes compatibles?

Desde que Stillmark en 1888 (citado por Andrews, 1992) describió la característica hemaglutinante de ciertos extractos de *Ricinus communis*, cientos de plantas han sido examinadas con objeto de analizar esta posible actividad frente a eritrocitos humanos (Makella, 1957).

Las sustancias aglutinantes fueron denominadas lectinas del latín *legere* que significa leer, seleccionar o elegir (Boyd y Shapleigh, 1954). En 1963, Boyd definió las lectinas como sustancias de origen vegetal con capacidad aglutinante y con un alto grado de especificidad hacia grupos sanguíneos de eritrocitos humanos y animales. Sin embargo, ante el descubrimiento de proteínas y glicoproteínas con similar especificidad y reactividad frente a determinados antígenos de carbohidratos de la membrana plasmática de distintos eritrocitos humanos, se revisó la definición del término. Gold y Balding (1975) propusieron que las lectinas eran proteínas específicas de receptores unidas a un resto glucosídico (glicoproteínas), siendo capaces de interactuar específicamente con azúcares o sus derivados. La definición no discriminaba entre glicoproteínas de origen animal o vegetal.

Las primeras extracciones y purificaciones parciales de lectinas en líquenes se realizaron en la década de los sesenta (Estola y Vartia, 1955). Más tarde, Lockhart *et al.* (1978), describieron una lectina parcialmente purificada como proteína implicada en el reconocimiento de fotobiontes del mismo líquen, verificando la naturaleza fúngica de esta proteína. En 1980, Bubrick y Galun aislaron y purificaron parcialmente una lectina del líquen *Xanthoria parietina* a la que denominaron *algal binding protein* (ABP), confiriéndole un papel de reconocimiento de fotobiontes compatibles en los primeros estadios de resíntesis del líquen en cultivo, reconocimiento que no ocurría en fotobiontes recién aislados.

Pool (1979), establece la importancia de la superficie de los biontes en el establecimiento inicial de otras simbiosis con células de *Chlorohydra*. Bubrick y Galun (1980), consideran que, de forma similar, la superficie de contacto (pared celular) entre los simbioses puede tener una importancia

esencial en el inicio de la simbiosis. Bubrick *et al.* (1981) localizaron esta lectina en la pared del micobionte, tanto en talos intactos como en cultivo del hongo y apuntaron la naturaleza glicosídica del receptor en la pared del fotobionte (Bubrick *et al.*, 1982). Todos estos trabajos y los posteriores coinciden en que la proteína sólo era capaz de unirse a fotobiontes en cultivo pero no a fotobiontes recién aislados postulando que la simbiosis provoca diferencias en la estructura (Honneger, 1984) y composición de la pared celular del fotobionte (Bubrick *et al.*, 1982; Marx y Peveling, 1983).

Galun *et al.* (1984) y Bubrick *et al.* (1985) describen la ABP como una proteína glicosilada de aproximadamente 12-13 kDa con capacidad de unirse de forma específica a algas compatibles en cultivo. Sin embargo, estos resultados son contradictorios. En 1980, Bubrick y Galun muestran que la lectina de *Xanthoria parietina* se une de forma específica al fotobionte de este líquen y de otros filogenéticamente próximos tales como *Caloplaca aurantia* y *Caloplaca citrica* pero no lo hace sobre paredes celulares de fotobiontes cultivados previamente aislados de especies no relacionadas (*Cladonia convoluta*, *Ramalina duriaei*, *Ramalina pollinaria*). Posteriormente, estos autores (Galun *et al.*, 1984) encuentran un porcentaje de unión de la lectina a fotobiontes cultivados de *Xanthoria parietina* del 100% pero sólo un 9,4% a fotobiontes de *Xanthoria steineri*, porcentaje incluso inferior que el obtenido frente a fotobiontes de *Physconia pulverulenta*, más alejada filogenéticamente de *X. parietina* que *X. steineri*.

Resultados similares a los expuestos se obtuvieron cuando se aisló una lectina de *Nephroma laevigatum* (cianolíquen) estableciéndose la importancia de la naturaleza y estado fisiológico del fotobionte en la interacción cianobacteria-lectina (Kardish *et al.*, 1991).

Por tanto, la cuestión de si las lectinas son proteínas de reconocimiento en la simbiosis líquénica esta aún sin resolver. Cabe plantearse qué papel pueden tener las lectinas en otro tipo de simbiosis, mutualista o parasitaria.

4. EL PAPEL DE LAS LECTINAS EN LA ASOCIACIÓN *Rhizobium*- LEGUMINOSAS Y OTRAS SIMBIOSIS

4.1. *Rhizobium*-leguminosas

El papel de las lectinas en este tipo de asociaciones resulta también difícil de establecer. Los primeros experimentos que relacionaban las lectinas con la interacción específica entre las leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* fueron realizados por Bohlool y Schmid (1974). Estos autores encontraron que lectinas aisladas de soja se unían a 22 de entre 25 cepas de *Rhizobium* capaces de nodular con la propia soja pero no se unían a 23 cepas no nodulantes con dicha leguminosa. Sin embargo, otros experimentos no ofrecían una correlación directa entre la unión de la lectina y la especificidad de la adhesión. Por ejemplo, Dazzo y Hubbel (1975) publicaron que la concanavalina A, aislada de *Conavalia ensiformis*, era capaz de unirse a 19 cepas de *Rhizobium* pero solamente dos de ellas eran capaces de formar nódulos con la planta de la cual se extrajo la lectina. Otros investigadores demuestran que algunas líneas de soja pueden nodular satisfactoriamente sin detectarse lectinas en su raíz. Estudios más recientes muestran que la unión de la lectina a *Rhizobium* varía con la edad del cultivo y las condiciones ambientales, lo cual podría explicar los resultados contradictorios anteriormente expuestos. Son pocos los estudios que aportan datos para establecer una hipótesis general entre lectinas y especificidad de la unión a bacterias susceptibles de formar nodulaciones efectivas. Por tanto, la tendencia general es no establecer una relación inmediata lectina-nodulación (Eitzler, 1985). No obstante, algunos experimentos parecen indicar especificidad en la unión. *Trifolium* produce una lectina, trifoliina A localizada en el extremo de los pelos radiculares, que se une específicamente a *R. leguminosarum* var *trifolii* pero no a *R. meliloti*. Esta lectina se une a 2-desoxiglucosa, monosacárido que inhibe la nodulación y además extrae la lectina de la pared. La unión de la bacteria al pelo de la raíz se realiza gracias a enzimas segregadas por dicho órgano que modifican

la capsula de la bacteria. Por otra parte, existe una correlación entre la pérdida de trifoliina A en la raíz y la reducción de la adhesión de la bacteria (Dazzo y Truchet, 1984). Diaz *et al.*, (1989) demostraron la implicación directa de la lectina en la nodulación utilizando técnicas de ingeniería genética entre dos variedades de la misma especie. *R. leguminosarum* var *viciae* que nodula con guisante y *R. leguminosarum* var *trifolii* que lo hace con trébol. Utilizando como vector *Agrobacterium rhizogenes* introdujeron el gen que sintetiza la lectina del guisante en el trébol, de forma que el trébol transgénico fue capaz de nodular eficazmente con *R. leguminosarum* var. *viciae*. Estos resultados parecen confirmarse en experimentos posteriores del mismo grupo. Eijssden *et al.* (1992), determinan las implicaciones de modificaciones en el aminoácido Asn¹²⁵ en la capacidad de ligamiento al sitio de unión.

Baver *et al.* (1979) sugirieron que los polisacáridos de la superficie de *Rhizobium* y aquellos segregados por la bacteria al medio son esenciales para que pueda ocurrir la interacción entre la bacteria y la planta. Algunas investigaciones más recientes (Lerouge *et al.*, 1990) han demostrado que la reacción de reconocimiento específico parece estar mediada por un polisacárido sintetizado por la bacteria, un tetrasacárido D-glucosamina, tres de cuyos restos amino están acetilados y uno acilado con un ácido graso C₁₆ no saturado. En la síntesis de este compuesto están implicados genes comunes del género *Rhizobium* y genes específicos de especie. Si esto se confirmara como generalidad, el papel de las lectinas quedaría relegado a la aglutinación de bacterias en la superficie del pelo radicular. Fry *et al.* (1993), describen que ciertos oligosacaridos similares a los factores de nodulación descritos por Lerouge *et al.*, (1990) pueden servir como sustrato para determinadas enzimas. Arnold *et al.* (1994) describe la importancia de distintos polisacáridos en el establecimiento de la simbiosis considerando los glucanos neutros de la pared de la bacteria esenciales en la formación de los nódulos, además, la deficiencia de ciertos exoglucanos induce una reacción defensiva de la planta hacia la bacteria.

4.2. Otras simbiosis

En relación con las simbiosis micorrizales, se han realizado estudios similares. Chaboud y Lalonde (1983) sugieren que los azúcares de la superficie de la pared del hongo *Frankia* podrían estar implicados en el reconocimiento específico del huésped, puesto que su composición difiere si los hongos se aíslan de diferentes asociaciones (*Alnus* o *Eleagnus*). Receptores específicos de lectinas (por ejemplo de concanavalina A) fueron detectados en la superficie de algunos hongos micorrizales infectivos que no aparecían en las líneas no infectivas. La presencia de estos receptores parecía un requisito indispensable para el establecimiento de la micoriza (Bonfante-Fasolo, 1988).

Recientemente, Giollant *et al.* (1993) han caracterizado una lectina de *Lactarius deteriorus*. Tras diferentes pruebas de adhesión concluyeron que las moléculas implicadas en el reconocimiento específico eran una lectina sintetizada por el hongo y el resto polisacárido de la pared celular de la radícula posiblemente formado por N-acetil-D-galactosamina. En trabajos realizados con endomicorrizas, Gianinazzi-Pearson *et al.* (1986) describen la secreción de fibrillas extracelulares del hongo en presencia de la planta huésped, aunque se postula que quizás éste sea un efecto secundario más que la naturaleza de un primer contacto. En cualquier caso, pocos son los trabajos realizados con micorrizas hasta el momento, por lo que no existen resultados concluyentes.

Los descubrimientos en otras simbiosis son casi tan variados como las simbiosis mismas. En la asociación entre cianobacterias-helecho (*Anabaena-Azolla*) se ha postulado la existencia de lectinas sintetizadas por el helecho como moléculas implicadas en el reconocimiento. En las asociaciones *Chlorella-Hydra*, los resultados hasta el momento concluyen que las lectinas o proteínas glicosiladas no están implicadas en el reconocimiento, postulando que la secreción de maltosa puede ser una señal de estímulo por parte de *Chlorella* hacia *Hydra* (McAuley y Smith, 1982).

Los datos expuestos no permiten en ningún caso generalizar la función biológica de las lectinas en estas asociaciones que, sin duda, deben ser analizadas más profundamente.

5.- ¿ESTAN RELACIONADAS LAS LECTINAS CON MECANISMOS PARASITARIOS? ¿Y CON MECANISMOS DE DEFENSA?

5.1. Mecanismos parasitarios

Actualmente se sabe que los hongos parásitos segregan una matriz extracelular que podría estar intimamente relacionada con mecanismos de adhesión específica y con el posterior ataque infectivo del hongo hacia el huésped.

Fue Ward (1888) el primero en describir la existencia de estos fluidos o matriz alrededor de los órganos de adhesión de *Botrytis* sp. Posteriormente, se ha descrito en numerosos hongos parásitos la existencia de esta matriz asociada a los tubulos germinativos (Jacobi *et al.*, 1982). Más adelante, algunos autores describieron que el hongo parásito segregaba una matriz, extracelular al medio minutos después del contacto con el huésped, matriz que estaría implicada en la interacción con el hongo y que pudiera ser inducida (Kunoh *et al.*, 1988; Mims y Richardson, 1989). La naturaleza química de esta matriz es compleja aunque se han detectado actividades enzimáticas degradativas relacionadas con el crecimiento de los apresorios y haustorios (Nicholson *et al.*, 1988). Por otra parte, fenómenos de tigmodiferenciación (forma y contacto del huésped) también parecen estar implicados (Hoch y Staples, 1987). La existencia de lectinas o proteínas glicosiladas entre la superficie de contacto del huésped y el parásito está extensamente descrita en la bibliografía. Sin embargo, las implicaciones fisiológicas de las lectinas en tal contacto resultan difíciles de establecer. En ocasiones, se ha descrito que las lectinas son sintetizadas por el huésped, actuando como moléculas quimiotáctiles, que atraen al parásito hacia la superficie del huésped actuando como receptor o pudiendo ser segregadas al medio (Nordbring-Hertz, 1988). Elad *et al.* (1983), describieron un reconocimiento específico del parásito por parte de la planta, puesto que las lectinas de la superficie del huésped reconocían receptores ricos en galactosa de la pared del parásito. En otras ocasiones, es el parásito el que sintetiza las lectinas capaces de unirse a la

superficie del huésped (Saikawa, 1982). Las implicaciones posteriores de esta adhesión se desconocen. Se postula que estas adhesiones favorecen la penetración haustorial o el ataque enzimático, son un punto de anclaje que estabiliza la asociación, inducen cambios morfogénicos que permiten la infección, están implicados en mecanismos de defensa-ataque, etc, pero los resultados obtenidos hasta el momento no permiten establecer una teoría general sobre la implicación de las lectinas en las asociaciones parásito-huésped.

5.2. Mecanismos de defensa

La literatura precedente muestra que las lectinas están implicadas en procesos de defensa en plantas ante procesos de parasitismo y depredación.

En 1981, Shannon y Hankins presentaron resultados altamente novedosos en los que se describía la capacidad enzimática de ciertas lectinas de soja, específicas de receptor. Estas proteínas glicosiladas presentaban actividades Ó-galactosidasa, Ó-manosidasa, etc. Estos autores describieron igualmente proteínas con estas actividades, que presentaban una alta homología con las glicoproteínas aunque no tenían actividad hemaglutinante.

Ante la dificultad de discernir el papel funcional de estas glicoproteínas (tal como hemos indicado hasta el momento) y en vista de los resultados, Shannon y Hankins (1981), postulan que la naturaleza hemaglutinante de estas proteínas puede no tener un significado fisiológico *in vivo* y que quizás sería necesario verificar la importancia enzimática de estas proteínas. En este sentido, Kumar *et al* (1993) describen el efecto inhibitor en la síntesis de proteínas así como el efecto antiviral e insecticida de una lectina de bulbos de *Ficaria hyemalis*.

Chrispeels y Raikhel (1991) describen dos fitoaglutininas en soja con una alta homología y codificadas por genes en tandem. Un inhibidor de la Ó-amilasa resultó ser igualmente codificado por un gen dispuesto en tandem y altamente homólogo a los genes que codificaban para las lectinas. Por otra

parte, este tipo de lectinas provocan lesiones y desarrollo anormal de las fibrillas de la mucosa digestiva de los depredadores (Lienes, 1986; Yokose *et al.*, 1991). Además, la unión específica de ciertas lectinas vegetales produce pancreatitis en rata (Jonas *et al.*, 1991; Jonas y Putzke, 1992; Jonas *et al.*, 1993). Han sido descritos otros mecanismos de actuación de las lectinas vegetales como glicoproteínas defensivas. Por ejemplo, Umekawa *et al.* (1992) describen efectos mitogénicos en linfocitos humanos. Suvachittanont y Peutgaiboon (1992) observan este mismo efecto en timocitos de rata.

Ciertas glicoproteínas vegetales que se unen específicamente a dominios de quitina (polímeros de N-acetil-D-glucosamina) son capaces de inhibir el crecimiento de hongos parásitos. Por otra parte, se ha comprobado que están localizadas fundamentalmente en el embrión, por lo que se les confiere un papel protector (Mirelman *et al.*, 1975). Posteriores estudios en este sentido confirmaron el efecto de estas lectinas como proteínas protectoras aunque algunos autores sospechaban la contaminación de la purificación de las glicoproteínas con quitinasas (Schlumbaum *et al.*, 1986). En 1989, Broekaert *et al.*, demostraron, tras purificación, que este efecto antimicrobiano de la glicoproteína no era consecuencia de contaminaciones. Por otra parte, la lectina y la enzima eran altamente homólogas (posiblemente procedentes de un gen ancestral común con posterior diferenciación), si bien su mecanismo de acción antimicrobiano era diferente. Mientras la enzima degradaba la pared del parásito, la glicoproteína producía cambios en la pared, engrosando la zona de crecimiento e impidiendo este proceso.

En relación con esto, investigaciones recientes (Viard *et al.*, 1993) han demostrado que levaduras de la especie *Kluyveromyces fragilis* son capaces de sintetizar lectinas segregables específicas de receptor con resto N-Acetil-D-glucosamina y D-galactosa, así como lectinas localizadas en pared que también se unen a restos D-galactosa. Esta última proteína aparece en dos formas moleculares, como dímero y octámero. La forma dimerica inhibe el desarrollo y crecimiento de nueve de doce especies de otras levaduras y está implicada en fenómenos de dimorfismo y diferenciación en *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. Esta es una de las primeras evidencias del efecto antifúngico de

ciertas levaduras frente a otras levaduras del mismo y de diferente género. La inhibición de la capacidad aglutinante de esta lectina (por incubación con D-galactosa) no inhibió el poder antifúngico.

En general, las implicaciones de las lectinas en la interacción parásito-huesped y su importancia fisiológica son cuestiones que no han sido resueltas hasta el momento, si bien los últimos datos de la literatura apuntan hacia la importancia morfogénica y enzimológica de estas proteínas relegando la importancia hemaglutinante a un papel secundario.

1.- Establecer las implicaciones de una lectina parcialmente purificada de *Xanthoria parietina* en el reconocimiento de fotobiontes compatibles e incompatibles.

2.- Analizar la posible naturaleza enzimática de dicha lectina (o proteína intratalina) y su receptor.

3.- Purificación hasta homogeneidad de esta proteína glicosilada (ABP), determinando posteriormente su posible naturaleza segregable. Para alcanzar este objetivo:

3.1. Extracción y purificación de la arginasa segregable de *Xanthoria parietina* (SA).

3.2. Caracterización bioquímica de ambas proteínas y su comparación.

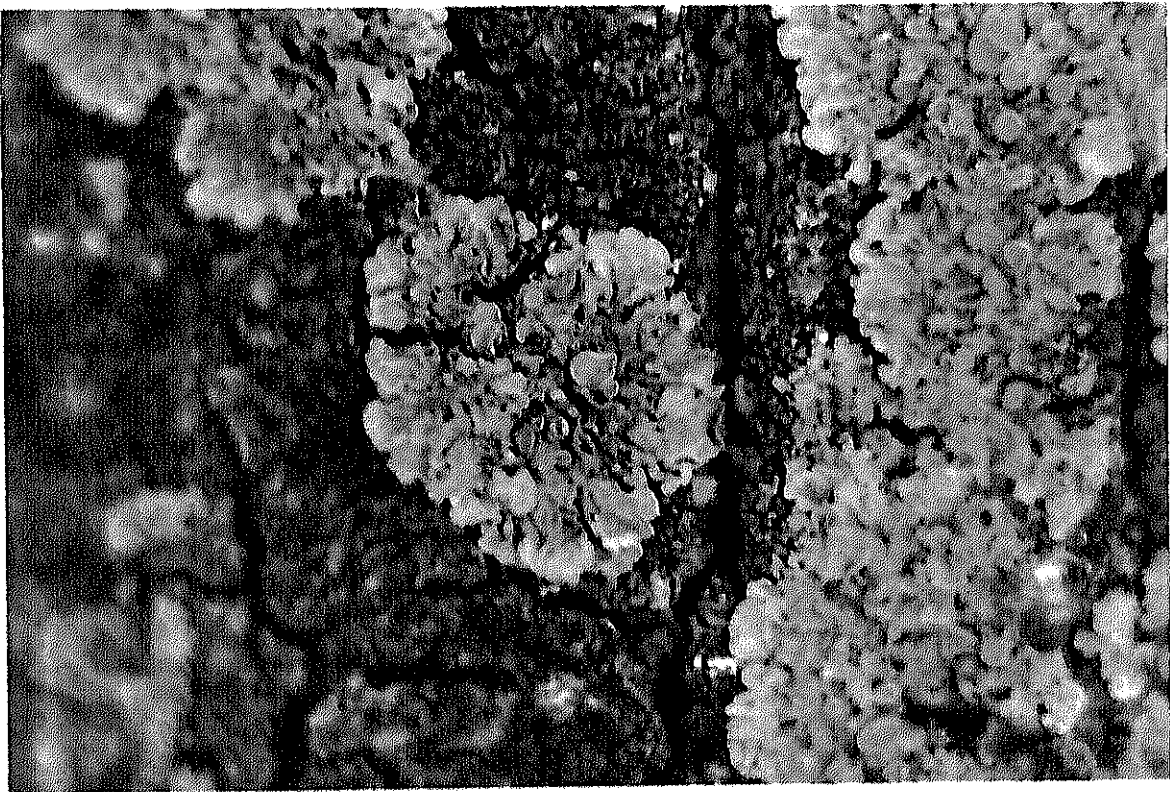
Determinación del grado de homología.

4.- Determinación de la función fisiológica de estas glicoproteínas (si se resolvieran como diferentes) en posibles mecanismos de parasitismo atenuado fúngico.

5.- Cultivo del fotobionte de *X. parietina* y estudio posterior del efecto de estas proteínas sobre los fotobiontes en cultivo axénico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Fig. 1. Fotografía del líquen *A. pyxietina* (L.) Th. Fr. sobre corteza de *Robinia pseudacacia* (L.).



1.- MATERIAL BIOLÓGICO

Xanthoria parietina (L.) Th Fr., fue recolectada de la corteza de *Robinia pseudacacia* (L.) siendo la zona de recolección el pueblo de Pedraza, en la provincia de Segovia. La Fig. 1. muestra un espécimen de este líquen. En algunos casos se llevaron a cabo experimentos con *Evernia prunastri* (L.) Ach creciendo sobre *Quercus pyrenaica* Lam., y recolectada de Valsain (Segovia).

2.- PURIFICACION PARCIAL DE LA LECTINA INTRATALINA

2.1. Extracto libre de células

La proteína intratalina fue parcialmente purificada de talos de *Xanthoria parietina* de acuerdo con Bubrick *et al.*, (1985).

15 g de talo seco fueron previamente hidratados e inmediatamente macerados a mano en un mortero con 50 ml de tampón fosfato salino (PBS). La composición de dicho tampón es: 1,5 mM KH_2PO_4 , 3,0 mM Na_2HPO_4 , 2,7 mM KCl, 0,4 mM MgSO_4 y 138 mM NaCl, pH 7,4, añadiendo 2,32 mM DTT y 15,0 mM azida sódica. El homogeneizado fue almacenado toda la noche a 4°C y luego centrifugado a 30 000 g durante 45 min a 2°C en una centrifuga Beckman J2-21 (rotor JA-21). La pella fue re-extraída con PBS durante 2h a 4°C, centrifugándola de nuevo tal como se indicó y juntando los dos sobrenadantes.

2.2. Precipitación con sulfato de amonio

El sobrenadante conjunto se llevó a 40% de saturación con sulfato de amonio en frío, almacenando la mezcla durante 2h a 4°C y luego centrifugándola a 30.000g durante 45 min a 2°C. El sobrenadante obtenido fue llevado al 60% de saturación con sulfato de amonio, almacenando la mezcla a 4°C durante toda la noche y centrifugandola posteriormente en las mismas condiciones arriba

indicadas. En este caso, el sobrenadante fue desechado y la pella resuspendida en 4,0 ml de PBS, dializando la disolución durante 24h frente a 5 litros de agua destilada y a continuación el contenido de la bolsa de diálisis fue microcentrifugado y la pella resuspendida en PBS. El baño de diálisis fue cambiado hasta dar reacción negativa a NH_4^+ .

2.3. Filtración por gel de Sephadex G-150

Cuando se indique, el extracto parcialmente purificado fue filtrado a través de una columna de Sephadex G-150 (12cm x 2.5cm) equilibrada con tampón PBS. El volumen muerto de la columna fue estimado en 45 ml con azul dextrano 2000. Las proteínas fueron eluidas en fracciones de 3 ml con tampón PBS y medida su absorbancia a 280 nm. En cada fracción se ensayo la naturaleza glicoproteica de la muestra (Dubois *et al.*, 1956) y la actividad arginasa (Legaz y Vicente, 1980).

3.-CARACTERIZACION PARCIAL DE LA LECTINA INTRATALINA

3.1. Medida de actividad arginasa

La actividad arginasa fue medida de acuerdo con el método de Greenberg, (1955) modificado por Legaz y Vicente (1980) incluyendo ureasa cristalizada (Sigma Chem. Co.) en la mezcla de reacción.

Dicha reacción ocurrió en un volumen final de 3,0 ml, conteniendo 30 mmol de tampón Tris-HCl, pH 9,15, 0,72 mmol L-arginina; 5,0 mmol de sulfato de magnesio y la proteína líquénica analizada disuelta en 1 ml de tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9.15. La urea producida durante 25 minutos de reacción a 30 °C fue hidrolizada simultáneamente por la ureasa cristalizada (33.8 mg en mezcla de reacción). La reacción fue interrumpida mediante adición de 0,5 ml de carbonato potásico saturado. Tras 2h de difusión del amonio formado y fijación del mismo sobre 1 ml de H_2SO_4 0,02N para formar sulfato de amonio, se tomaron 0,5 ml del producto de reacción, redisolviéndose en 4,5 ml de agua

destilada (Conway, 1962). Los controles fueron preparados sustituyendo el sustrato (L-arginina) por un volumen igual del tampón utilizado. La valoración de amonio se realizó mediante la reacción de Nessler (Standard Methods, 1955), midiendo las absorbancias a 440 nm en un Espectrofotómetro Zeiss PM2 DL. Los datos de absorbancia se interpolaron en una recta patrón construida con concentraciones crecientes de sulfato de amonio. La velocidad de reacción se determinó como mmol de amonio producido por unidad de tiempo. La unidad de actividad específica fue definida como 1,0 mmol de amonio formado por mg de proteína y por minuto.

Cuando se indique, 5,0 ml de la proteína parcialmente purificada fueron cromatografiados en una columna de Sephadex G-150 (32,0 cm x 2,5 cm) equilibrada con tampón PBS, pH 7,4. El volumen muerto fue estimado en 45 ml con azul dextrano. La proteína se eluyó en fracciones de 3,0 ml, a flujo continuo, midiéndose su absorbancia a 280 nm y valorándose su actividad arginasa como se indicó anteriormente.

3.2. Ensayo de azúcares totales

1 ml de cada fracción fue sometida a hidrólisis ácida con objeto de determinar la naturaleza glicoproteica de la proteína eluida según el método de Dubois *et al.*, (1956).

La mezcla de reacción contenía 1,0 ml de la proteína parcialmente purificada, 1,0 ml de fenol al 5% en agua destilada, y por último, 5,0 ml de ácido sulfúrico 96% añadido gota a gota en el centro de la mezcla de ensayo. Se preparó un blanco sustituyendo la muestra por 1,0 ml de agua bidestilada. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente, valorando la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro Zeiss PM2 DL. Los valores de absorbancia resultantes se transformaron en mmoles de azúcar presente en la muestra mediante una recta patrón construida con concentraciones crecientes de glucosa (Sigma Chem. Co.)

4.-MARCAJE DE LA PROTEINA PARCIALMENTE PURIFICADA

4.1. Marcaje con fluoresceína

La proteína parcialmente purificada y dializada fue marcada con fluoresceína (Sigma Chem. Co.) incubando 1,0 mg de proteína total con 1,0 mg de fluoresceína disuelta en 1,0 ml de acetona:agua (1:1, v/v) durante 2h a 26°C en oscuridad. La acetona favoreció la solubilidad de la fluoresceína. El exceso de fluoresceína fue eliminado por filtración de la mezcla a través de una columna de Sephadex G-25 (11.0 cm x 1.0 cm). El volumen muerto de la columna fue medido con azul dextrano 2000. La proteína fluorescente, recuperada del volumen muerto, fue utilizada en experimentos de ligamiento.

4.2. Marcaje con ferritina

La proteína parcialmente purificada fue marcada con ferritina (Sigma Chem Co.) siguiendo el metodo de Bayer *et al.*, 1976). Una disolución de ferritina y la proteína intratinalina se incubó con glutaraldehído 0.05% durante 1h a temperatura ambiente. La mezcla fué alcalinizada con 1M de bicarbonato de amonio y dializada toda la noche frente a tampón PBS a 4°C. Los agregados de alto peso molecular (ferritina-glutaraldehído-ferritina) fueron eliminados por centrifugación del dializado a 10.000 g durante 30 min a 2°C. El sobrenadante fue centrifugado a 22.000g durante 3h y el precipitado, que contenía la fracción ferritina-glutaraldehído-lectina, fue resuspendido en 5,0 ml de tampón PBS y luego filtrada a través de una columna de Sephadex G-150 (30cm x 3cm) equilibrada con tampón PBS. La proteína eluída entre las fracciones 110 a 125ml fue utilizada en los experimentos posteriores.

4.3. Valoración de actividad arginasa en lectinas marcadas.

Con objeto de valorar el posible efecto del marcaje de la lectina intratalina sobre su actividad arginasa, 0,43 mg de lectina marcada con fluoresceína y 0,34 mg de lectina marcada con ferritina fueron utilizados para valorar la actividad arginasa (Legaz y Vicente , 1980), tal como se indicó en el apartado 4.1. Así mismo, 300 mg de arginasa comercial (Sigma Chem. Co.) sin y con ambos marcadores fueron incluidos en la mezcla de reacción, valorando la actividad arginasa por microdifusión.

5.- CURVA DE ACTIVIDAD UREASA EN PARED DEL FOTOBIONTE

5.1. Aislamiento de los fotobiontes

Células del fotobionte fueron aisladas de muestras de 6 g de talo de *Xanthoria parietina* de acuerdo con Ascaso, (1980). Las muestras fueron rehidratadas y maceradas en 20 ml de tampón PBS, pH 7.4. El homogeneizado fue filtrado por una gasa triple y el filtrado, centrifugado durante 10 min a 1.000g. El precipitado fue resuspendido en 8 ml de sacarosa 0.25 M. Esta suspensión (4 ml) se depositó cuidadosamente sobre 5 ml de IK al 80% en agua destilada. Tras centrifugar a 500g durante 60s se recogieron las algas unicelulares acumuladas en la interfase. Las células fueron lavadas 3 veces con tampón PBS.

5.2. Inducción de ureasa

Los fotobiontes fueron incubados en 15ml de tampón fosfato 75 mM, pH 6.9 (Vicente y Perez-Urria, 1989) con distintas concentraciones de urea: 0mM, 10mM, 20mM, 40mM, 80mM y 100 mM durante 8h en agitación constante, a una temperatura de 26°C y en obscuridad. A cada hora, se tomaba una muestra de 3 ml de cada cultivo y se aislaban paredes celulares de los fotobiontes.

5.3. Aislamiento de paredes celulares

Las paredes del fotobionte se aislaron según indican Brunner y Honegger, (1985). Los fotobiontes recogidos por centrifugación y lavados en tampón fosfato 75 mM, pH 6.9 fueron macerados en un mortero con 5,0 ml de tampón y centrifugados a 3.200 g para aislar paredes (Brunner y Honnerger, 1985). El precipitado fue lavado en 5,0 ml de acetona para eliminar fenoles, posteriormente resuspendido en 2,5 ml de tampón fosfato 75 mM, pH 6,9 y sometido a sonicación durante 5 min a $20 \text{ Kciclos} \times \text{s}^{-1}$ en frío en un sonicador MSE 100 WATT ultrasonic. El extracto fue centrifugado a 3200g durante 30 min a 2°C (Legaz y Vicente, 1989). Una muestra del precipitado fue teñida con azul de metileno y observada en microscopía óptica para verificar la ausencia de membranas contaminantes.

5.4. Valoración de actividad ureasa

A continuación se valoró la actividad ureasa en pared utilizando el método de microdifusión de Conway, (1962). La actividad enzimática fue medida como amonio producido en la mezcla de reacción. Dicha mezcla contenía 30 mmol de tampón fosfato potásico, pH 6.9, 19,8 mmol de urea y el extracto proteico en un volumen final de 3 ml. La reacción se mantuvo a 32°C durante 25 min. Tras este período, la reacción se paró con carbonato potásico saturado. La microdifusión de amonio así como su valoración se realizaron tal como indica el apartado 3.1. Una unidad de actividad específica ureasa se definió como 1,0 mmol de amonio producido por mg de proteína y por minuto. La velocidad de reacción se definió como mmol de amonio producidos por unidad de tiempo. Para valorar proteínas en pared una muestra de las mismas en cada ensayo fue tratada con Triton X-400 al 5% durante 2h a 4°C y luego dializada frente a 5 litros de agua destilada para eliminar el detergente. El dializado se llevó al 2% con NaCl (p/v) y se sonicó durante 5 min en frío (a intervalos de 30 segundos) según Legaz y

Vicente, (1989). El resto de las paredes insolubles en agua se eliminó por centrifugación a 28.000 g durante 30 min a 2°C. Las proteínas se valoraron siguiendo el método de Lowry *et al.*, (1951).

5.5 Efecto de la parietina sobre la actividad ureasa en pared.

5.5.1. Extracción y purificación de parietina

La parietina fue preparada por maceración de 5 gr. de *Xanthoria parietina* con acetona para extraer los fenoles liquénicos. Más tarde se adicionó eter dietílico al extracto acetónico (3:1, v/v) y la mezcla se mantuvo en agitación fuerte durante 1 hora. El proceso fue repetido tres veces. La fase etílica fue recogida y secada por corriente de aire (Asahina y Shibata, 1954). La pureza de la extracción se verificó analizando la muestra por HPLC en fase reversa.

Un espectro de absorbancia de parietina pura disuelta en acetona se realizó con objeto de determinar el máximo de absorbancia para lo cual se utilizó un espectrofotómetro DMS 90 UV-visible asociado a un integrador JJ instruments CR 450A. El espectro se realizó entre 250 y 700 nm con una velocidad de barrido de $4\text{nm}\times\text{min}^{-1}$.

5.5.2. Valoración de actividad ureasa en paredes.

Fueron utilizados fotobiontes recién aislados de 10 g de *X. parietina* (Ascaso, 1980) para aislar paredes tal como se indicó en el apartado 5.3. Las paredes fueron lavadas tres veces en acetona con objeto de eliminar los fenoles y secadas en corriente de aire. Estos lavados se evitaron cuando se analizó el efecto de la parietina endógena en la actividad ureasa de pared.

La actividad ureasa se valoró por el método de Conway (1962) tal como se indicó en el apartado 5.4. En la mezcla de reacción se añadieron 11,4 mg de parietina por mg de proteína (valoración cuantitativa por HPLC) preparando, en paralelo, un control sin esta antraquinona y paredes sin lavar en acetona. La concentración de proteína se determinó de acuerdo con Lowry *et al.*, (1951).

La paretina se disolvió en tampón fosfato 75 mM, pH 6,9 durante 3 días a temperatura ambiente mediante agitación constante en oscuridad. La estabilidad del fenol en el tampón de reacción se verificó por HPLC.

Por otra parte, la actividad enzimática de ureasa comercial (Sigma Chem. Co.) fue analizada en presencia y ausencia de 10 mg de paretina por 50 mg de ureasa cristalizada.

5.5.3. Valoración de la concentración de paretina por HPLC.

La cantidad de paretina se estimó por HPLC en fase reversa utilizando un cromatógrafo Varian 5000 equipado con un integrador Vista CDS 401 y un detector Spectra Physic UV 2000 según Pedrosa y Legaz, (1993).

a) Condiciones Cromatográficas

- Columna: Nucleosil 5 C8 (12,5 cm x 4 mm)
- Fase móvil: acetonitrilo:ácido acético:agua
(80:19,5:0,5, v/v)
- Flujo: $0,7 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$
- Condiciones isocráticas
- Temperatura: 26°C
- Presión: 56 atm
- Volumen de inyección: 10 µl
- Tiempo de análisis: 10 min

b) Condiciones de integración

- Atenuación 64

c) Condiciones de detección

- Detección ultravioleta a 290 nm
- U.A.F.E. 0.002

6.- LIGAMIENTO DE LA LECTINA INTRATALINA DEL MICOBIONTE

6.1. Ensayo de ligamiento a paredes del fotobionte

Fotobiontes extraídos de 3,0 g de *Xanthoria parietina* fueron incubados en obscuridad con urea 100 mM durante 2h (condiciones de elevada presencia de ureasa en pared) con objeto de inducir el posible receptor. A continuación, se aislaron paredes celulares tal como se indicó anteriormente. Las paredes fueron resuspendidas en 3,0 ml de tampón PBS y separadas en tres alícuotas de 1,0 ml cada una. En una de ellas se ensayó directamente actividad ureasa (Conway, 1962). La segunda y tercera alícuota fueron incubadas con 0.1 mg de lectina intracelular en 2,0 ml de tampón. La incubación se realizó en obscuridad a 26°C durante 2h. Después, fue añadida galactosa, a una concentración 10 mM en volumen final, a la tercera alícuota durante 30 min a 26°C. Por último, todas las muestras fueron centrifugadas a 3.200 g durante 15 min a 2°C.

6.1.1. Actividad enzimática de la lectina y su receptor

En todos los ensayos, se valoró la actividad arginasa de la lectina y la actividad ureasa en pared antes y después de los ensayos de ligamiento, con objeto de verificar si la unión se había producido y si ésta podía modificar dichas actividades. Tras la incubación, una alícuota fue utilizada para desorber la lectina con galactosa 20 mM durante 30 min. Las células fueron recogidas por centrifugación a 10.000g durante 15 min a 2°C y lavadas en tampón PBS. Tras aislar paredes celulares (como se indica en el apartado 5.3), se valoró actividad arginasa y ureasa (Conway, 1962) tal como se indicó en los apartados 3.1. y 5.4. El sobrenadante fue utilizado para valorar actividad arginasa en todos los tratamientos. Las proteínas se estimaron por el método de Lowry *et al.*, (1951).

6.2. Ensayo de ligamiento a fotobiontes usando lectina marcada

Para ensayar la unión de la lectina fluorescente o marcada con ferritina a los fotobiontes, se utilizaron tres diferentes muestras.

Talos de *Xanthoria parietina* recién recolectados (1,0 g de peso seco) fueron incubados durante 2h en 20 ml de urea 100 mM en tampón fosfato potásico 75 mM, pH 6,9. Talos recién recogidos sin ningún tratamiento fueron utilizados como control. Los fotobiontes se aislaron en ambos casos según Ascaso, (1980). Una tercera muestra fue preparada incubando células algales durante 2h en 5 ml de urea a 100 mM en tampón fosfato potásico 75 mM, pH 6,9 con luz y movimiento continuo.

También se aislaron fotobiontes de *Evernia* (Ascaso, 1980). Las algas fueron incubadas en urea 40 mM durante 4h, dado que éstas son las condiciones óptimas de secreción y localización de ureasa en pared (Vicente y Perez-Urria, 1989).

Después de las incubaciones, las células fueron repetidamente lavadas con agua destilada. Las muestras de algas (aproximadamente 10 mg peso seco) fueron incubadas durante 30 min con 1,0 mg de lectina marcada con fluoresceína o 1,2 mg de lectina marcada con ferritina en tampón PBS. Tras la incubación los fotobiontes fueron lavados con tampón PBS y observados por microscopía de fluorescencia y por microscopía electrónica, respectivamente.

6.2.1. Microscopía de fluorescencia

Se utilizó un microscopio de fluorescencia Axioskop Zeis-MC80 (West Germany) con filtros de detección de fluorescencia entre 400 y 700 nm. Las fotografías se realizaron mediante exposición automática, utilizando una película color Agfachrome 100 ASA.

El área de las células fue estimada utilizando un programa tamaño-forma cargado en un analizador de imagen PS/2 IBM 30 con tabla digitalizada. Por último, se contabilizó el número de células totales por campo (con observación de cinco campos diferentes elegidos al azar) así como el

número de células con fluorescencia roja y verde-amarilla, aplicando estadísticos matemáticos en los datos con objeto de determinar diferencias estadísticamente significativas.

6.2.2. Microscopía electrónica de transmisión

Las células fueron abundantemente lavadas con tampón fosfato 0,1 M y preparadas mediante técnicas de microscopía electrónica convencional.

Las muestras se fijaron, resuspendiendo las células en fijador doble paraformaldehído 4% - glutaraldehído 0.1% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0 durante 4 horas a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron en tampón durante 30 min (2 veces), recogiendo por centrifugación a 10.000 g durante 15 min a 2°C. La deshidratación de las células se realizó con concentraciones crecientes de etanol. El precipitado se resuspendió en 2,0 ml de etanol al 50% durante 20 min, cambiando el alcohol a los 10 minutos. A continuación, se repitió el proceso utilizando etanol al 70 %. Esta solución fue sustituida por acetato de uranilo al 1% en alcohol al 70 % durante toda la noche. El proceso de deshidratación se completó con concentraciones de alcohol crecientes: 80%, 90% y 100%, cada una de las cuales se mantuvo durante 20 min haciendo cambios a los 10 min.

La inclusión se realizó resuspendiendo las células deshidratadas en óxido de propileno durante 5 min y a continuación en una disolución óxido de propileno:araldita II (1:1, v/v) durante 1h a temperatura ambiente. Esta mezcla se sustituyó por araldita II en la que se mantuvieron toda la noche. Las células se centrifugaron durante 5 min a 3.000 g y el sobrenadante de araldita se desechó. La pella se recogió en cápsulas que se rellenaron con araldita II, dejándose durante 3 días a 70°C con el fin de que polimerizase la resina.

Secciones ultrafinas (600 Å) fueron obtenidas utilizando un Ultramicrotomo Om/U2 Reichert. Las rejillas fueron preparadas sin teñir y observadas en un microscopio electrónico Philips EM 300.

6.3. Ensayo de ligamiento en fotobiontes con lectina no marcada. Citoaglutinación.

Fotobiontes recién aislados de 15 g de *Xanthoria parietina* (Ascaso, 1980) fueron repetidamente lavados con tampón PBS y resuspendidos en 3,0 ml de tampón estéril (121°C, 1 atm, 20 min). Una alícuota de 1,0 ml fue incubada en 50 ml de Medio basal de Bold líquido (Devon and Bold, 1960) que contenía 1,0 mg de lectina intratinalina disuelta. La preparación del medio BBM-líquido se describe en el apartado 17.1. Los otros 2,0 ml fueron incubados en 50 ml de BBM con arginina 28 mM durante 30 min. Después de este tiempo, las células fotosintéticas fueron recogidas por filtración (Millipore 0.22 mm de diámetro de poro) en condiciones estériles, lavadas con agua bidestilada y estéril. Una alícuota de 1,0 ml fue incubada con 50 ml de urea 100 mM durante 2h con objeto de inducir el receptor de pared. Las células fueron recolectadas por centrifugación y lavadas abundantemente. La última alícuota de 1,0 ml fue incubada directamente con BBM-líquido que contenía 1,0 mg de lectina evitando la inducción del receptor. Las incubaciones se realizaron en luz a 25 °C y en agitación, conteniendo cada medio de incubación 5.000 unidades de penicilina (benzetazil, antibióticos farma S.A.) para evitar contaminación bacteriana.

Las células fueron puestas en contacto con la proteína un tiempo máximo de 3 h. Durante este tiempo, se tomaron muestras a 0, 1, 2 y 3h observándolas en un microscopio de luz blanca Labophot Nikon (Japan) con un expositor automático asociado al sistema óptico. La película utilizada fue Plus-X-Pan, 125 ASA.

También se valoró el incremento en peso seco de alícuotas de 1,0 ml tomadas antes y después del tratamiento, así como la concentración de clorofilas. Alícuotas de 1,0 ml de las muestras recogidas a los tiempos indicados fueron sometidas a extracción de clorofilas utilizando acetona al 80% (1:4 acetona pura, v/v) y almacenándose en oscuridad a temperatura ambiente durante toda la noche. Las células se eliminaron por centrifugación a 10.000 g durante 15 min a 2°C y el sobrenadante se recogió

con objeto de valorar la concentración de clorofilas (Strain *et al.*, 1971), midiendo la absorbancia a 649 y 665 nm en un Espectrofotómetro Zeiss PM2 DL.

6.4. Ensayo de ligamiento a eritrocitos. Hemaglutinación.

30 ml de proteína (0.37 mg ml^{-1}) diluida en suero salino (Lockhart *et al.*, 1978) fue incubada con 30 ml de sangre humana del grupo B- en preparaciones en fresco y selladas. Muestras idénticas de sangre fueron incubadas con 30 ml de suero salino como control. Las preparaciones se observaron a tiempo 0, 5 min y 15 min en un microscopio de luz blanca Labophot Nikon (Japan) con un expositor automático asociado al sistema de lentes. La película utilizada fue Plus-X-Pan de 125 ASA.

7.- ABSORCION DE ARGININA EXTRACELULAR

Fotobiontes aislados de 15 g de talo de *Xanthoria parietina* fueron lavados 3 veces con tampón pH 7.4 en condiciones estériles e incubados en 50 ml del tampón indicado anteriormente conteniendo 28 mM de arginina (Sigma Chem. Co.) y 5.000 unidades de penicilina . La incubación se realizó durante 30 min. Pasado este período, se valoró la concentración de arginina en el medio y en el espacio intracelular a tiempo 0 y 30 minutos, tomando 15 ml del medio de incubación antes de añadir la arginina (tiempo 0) y después del tiempo de incubación (tiempo 30 min). Las células se recogieron por centrifugación a 10.000 g durante 15 min a 2°C, valorándose el peso seco en ambos tratamientos.

7.1. Extracto libre de células

Las algas se resuspendieron en 2 ml de tampón Tris-HCl 10mM pH 9,15. Se maceraron en un mortero con alumina tipo A-5 (Sigma Chem. Co.) y se sonicaron durante 5 min a $70 \text{ Kciclos s}^{-1}$ en frío, alternando la sonicación con paradas de 30 s. El sonicador utilizado fue un desintegrador MSE 100 WATT. El extracto libre de células se recogió por centrifugación a 10.000 g durante 15 min en frío.

7.2. Varolación de arginina

La concentración intracelular y extracelular de este aminoácido se valoró mediante el método de Greenberg 1955 incluyendo ureasa cristalina (Sigma Chem. Co.) y arginasa (Sigma Chem. Co.). La mezcla contenía un volumen final de 3,0 ml: 30 mmol tampón Tris-HCl pH 9,15; 5,0 mmol de sulfato de amonio y 1,0 mg de arginasa disuelta en el tampón de reacción. La ureasa producida durante 1h de reacción a 30°C fue hidrolizada simultáneamente por ureasa cristalina (33.8 mg). La reacción fue interrumpida por adición de 0.5 ml de carbonato potásico saturado. Tras dos horas de difusión del amonio formado y fijación sobre 1,0 ml de H₂SO₄ 0,02 N para formar sulfato de amonio, se tomaron 0.5 ml del producto de reacción, redisolviéndose en 4.5 ml de agua destilada (Conway, 1962). La valoración de amonio producido se realizó utilizando el reactivo Nessler (Standard Methods, 1955) midiéndose absorbancia a 440 nm. La concentración de aminoácido se estimó en relación con la absorbancia del medio a tiempo 0 (28 mmoles ml⁻¹) y el resto de los ensayos. En el caso de la arginina intracelular, los resultados se presentan en función del peso seco de las algas.

8.- ANALISIS DE LA LECTINA INTRATALINA POR HPLC DE EXCLUSION MOLECULAR

8.1. Unión lectina-receptor de pared por HPLC

Muestras de 1,0 ml de lectina fueron incubadas con fotobiontes inducidos con urea 100 mM durante 2h o fotobiontes no tratados y recogidas por centrifugación a 10.000 g durante 15 min a 2°C (como se indicó anteriormente). Los sobrenadantes fueron liofilizados y dializados frente a tampón Tris-HCl pH 9.15.

8.1.1. Condiciones de análisis

Aproximadamente 20 mg de proteína total en un volumen de inyección de 10 ml fue cromatografiada como se indica:

a) Condiciones Cromatográficas

- Columna TSK gel rellena con G5000 PWXL (300mm x 7.8mm) de acuerdo con Borkovich y Weiss (1987)
- Fase móvil: Tampón Tris HCl 10 mM pH 9.15.
- Temperatura: 25 °C
- Flujo: $0.3 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$
- Presión: 7 bares
- Volumen de inyección: 10 ml.

b) Condiciones de integración

- Atenuación: 64

c) Condiciones de detección

- Detección por absorbancia a 280 nm.
- U.A.F.E.: 0,002

El equipo cromatográfico usado fue un Spectra Physic SP8800 equipado con un integrador SP-4290 (Legaz *et al.*, 1990; Pedrosa y Legaz, 1991b). La detección de las muestras se realizó con un Spectra Physics SP8490 U-UV.

Tras la obtención de cromatogramas correspondientes a las dos muestras analizadas se realizó el cromatograma diferencia.

8.2. Lectina marcada con fluoresceína o ferritina analizada por HPLC

Aproximadamente 20 mg de proteína marcada con fluoresceína fueron cromatografiadas en el sistema cromatográfico descrito en el apartado anterior. El mismo tampón fue utilizado como fase móvil. En este análisis, el detector fue un fluorímetro Fluorichrom TM de Varian y un detector ultravioleta-visible de Spectra Physic (SP8490) en serie. Las proteínas eluidas fueron detectadas por la emisión de fluorescencia y por su absorbancia en el ultravioleta (280 nm). La longitud de onda de excitación fue de 340 a 380 nm utilizando filtros 7-54 y 7-60 de Varian y la longitud de onda de emisión de 460 nm, detectada mediante el uso de filtros 3-71 y 4-76 de Varian.

La lectina (20 mg) inicialmente marcada con ferritina fue previamente cromatografiada en una columna de Sephadex G-150 (32cm x 2.5cm), recogiendo aquellas fracciones con mayor concentración de proteínas, valoradas por absorbancia a 280 nm y que contuvieran mayor concentración de ión Fe^{+2} detectado por medida de absorbancia a 430nm. Estas fracciones fueron colectadas y liofilizadas para posteriormente analizarlas por HPLC.

Cuando las muestras se marcaron con ferritina, solamente se observaron utilizando el detector de ultravioleta-visible a 280 nm.

9.- LOCALIZACION CITOQUIMICA POR MICROSCOPIA DE UREASA EN PAREDES DEL FOTOBIONTE

9.1. Unión lectina-receptor de pared. Detección citoquímica por TEM

Fotobiontes recién aislados (Ascaso, 1980) de 3,0 g de talo de *Xanthoria parietina* fueron incubados en urea 100mM durante 2h en tampón fosfato 75mM pH 6.9 con objeto de inducir el receptor de pared. Fue también preparado un control sin inducción. Dos alicuotas iguales de fotobiontes inducidos en suspensión en 2,0 ml de tampón fueron incubados en tolbutamida 10 mM

(Sigma Chem. Co.), un inhibidor específico de ureasa (Vicente y Pérez-Urria, 1988) durante el tiempo de reacción o en $0.1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ de lectina durante 2h a 26°C previamente al ensayo enzimático. En estos casos, las células fueron lavadas con tampón antes de incluirlas en la mezcla de reacción.

9.1.1. Reacción citoquímica de ureasa.

Los cuatro tipos de muestras se recogieron por centrifugación a 10.000 g durante 15 min a 2°C . A continuación se incubaron con 0.1 M Fast Green durante 10 min (Sigma Chem. Co.) en tampón fosfato 75 mM pH 6.9. De esta forma se bloquean los fenoles con objeto de eliminar la quelación del cobalto (Lison, 1960). Las algas se incubaron durante 30 min a 37°C en agitación constante con urea 2% (p/v) y cloruro de cobalto 9.2 mM en alcohol al 60% (Gomori, 1952).

La ureasa en presencia de urea en un medio acuoso rinde amonio y ácido carbónico el cual, al reaccionar con cloruro de cobalto, produce carbonato de cobalto. La reacción se hace visible al microscopio electrónico al añadir al medio de reacción 30 ml de sulfuro de amonio 0.1 M . El carbonato de cobalto y el sulfuro de amonio forman carbonato de amonio y sulfuro de cobalto. Esta sal precipita allí donde se forma. Su composición metálica la hace densa a los electrones y detectable por microscopía electrónica de transmisión.

9.1.2. Microscopía electrónica de transmisión

El método de preparación de las muestras es convencional para detección citoquímica y ha sido descrito en el apartado 6.2.2.

9.2. Unión lectina-receptor de pared. Detección citoquímica por microscopía óptica.

Tres diferentes muestras fueron preparadas para observar y cuantificar la presencia de ureasa en pared celular. Talos de *Xanthoria parietina* fueron incubados durante 2h en 20 ml de urea 100 mM en tampón fosfato 75 mM , pH 6.9. Por otra parte, células algales recién aisladas (Ascaso, 1980) fueron

incubadas durante 2h en 5,0 ml de urea 100 mM en tampón fosfato en luz y con agitación constante.

Un control de algas recién aisladas fue incubado durante 2h en tampón.

Tras los tratamientos, las células se lavaron 3 veces con tampón fosfato y se sometieron a la reacción citoquímica descrita en el apartado 8.1.1. Por último, las células se lavaron nuevamente 3 veces con tampón y se observaron en un microscopio óptico Zeiss IM (West Germany), utilizando condensadores y objetivos de contraste de fase. La cuantificación numérica permitió determinar el porcentaje de células ureasa positivo y aplicar los estadísticos matemáticos pertinentes.

10. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE XANTHORIA PARIETINA

Las modificaciones provocadas en la ultraestructura de los líquenes, consecuencia de los distintos tratamientos, se valoró por microscopía electrónica de transmisión.

10.1. Tratamientos previos

Muestras de 1,0 g de talo de *Xanthoria parietina* fueron incubadas en 10 ml en urea 100 mM en tampón PBS, pH 7,4, durante 2h para inducir ureasa. Parte de estas células fueron previamente incubadas con arginina 28 mM en 10 ml de tampón y después fueron lavadas dos veces con agua destilada e incubadas en 5,0 ml de lectina ($74 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$) durante 18 horas a 25°C. Otras muestras fueron incubadas con arginina 28 mM y 5,0 ml de lectina tal como se indica anteriormente, pero sin inducir ureasa en pared. Fue también preparado un control incubando únicamente con arginina 28 mM. Por último, muestras no tratadas fueron incubadas en tampón durante un período idéntico a aquellos talos incubados con los diferentes metabolitos.

10.1.1. Microscopía electrónica de transmisión.

Las muestras fueron deshidratadas y fijadas tal como describen Ascaso y Galván, (1976). Pequeñas muestras de talo (2-3 mm) fueron fijadas en glutaraldehído al 3% en tampón fosfato 50 mM, pH 7.1 durante 3h a 4°C. Las muestras fueron lavadas toda la noche y post-fijadas en tetróxido de osmio 1% (v/v) a temperatura ambiente en oscuridad durante 3h. Tras lavar las muestras abundantemente en tampón, fueron deshidratadas en disoluciones crecientes de etanol. El alcohol se substituyó por óxido de propileno:Spurr de forma que la inclusión final se realizó en Spurr puro (Spurr, 1969) a 70°C durante 3 días. Las ultrasecciones fueron teñidas con citrato de plomo (Reynolds, 1963) y observadas en un microscopio electrónico Philips EM 300.

10.1.2. Análisis microbiológico

Se llevó a cabo un lavado superficial de 1,0 gramo de talo en condiciones estériles con agua destilada. Aproximadamente 1,0 ml de agua de lavado fue inoculada en placas agar-agar (Merck) al 2% y cultivadas durante 24 h a 37°C. Después de obtenerse las primeras colonias bacterianas, se realizó un análisis microbiológico utilizando PanthoTec-U Test.

10.2. Alteraciones ultraestructurales en fotobiontes aislados

10.2.1. Microscopía electrónica de transmisión

Con objeto de establecer si las condiciones óptimas de secreción de ureasa pueden provocar daños estructurales en los fotobiontes o por el contrario pueden ser utilizadas para los posteriores análisis con la lectina purificada, se establecieron dos ensayos. Una alícuota de suspensiones de *Trebouxia* se incubó en urea 100 mM en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 6,9, durante 4h. Otra alícuota fue preparada como control, incubandose en paralelo únicamente con tampón.

Los fotobiontes fueron tratados para posterior observación al microscopio electrónico de transmisión tal como se indica en el apartado 10.2. Con objeto de facilitar la metodología de trabajo, las algas fueron preincluidas en agar-agar y posteriormente este bloque se fragmentó en pequeñas piezas de 2-3 mm². Tras la deshidratación, las muestras fueron transferidas a diluciones de araldita I en óxido de propileno (1:3; 2:2; 3:1) cada dos horas. Tras dos horas en araldita I pura las muestras se cambiaron a araldita II sobre la que se realizó la inclusión final.

10.2.2. Microscopía electrónica de barrido

Las algas previamente tratadas fueron adheridas a un soporte biológico denominado bioskin para lo cual las algas en suspensión en tampón fosfato 10 mM, pH 7,0 fueron depositadas en la matriz fibrilar del bioskin, dejándose almacenadas toda la noche a temperatura ambiente. A continuación, pequeños fragmentos del bioskin (3-4 mm²) se prepararon para observación ultramicroscópica.

Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2% en una solución de Millonig-fosfato (tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2) durante 4 ó 5 horas a 4°C. Como disolución lavadora se empleó Millonig-glucosa, a la que se añadió cloruro-cálcico al 1%. La deshidratación se realizó en series crecientes de acetona al 40% hasta acetona de 100%. Posteriormente, las muestras fueron llevadas al punto crítico (71 bares, 41°C) hasta la sustitución de la acetona en un desecador Balzer (CPD 030) utilizando como fluido de transición CO₂. Las muestras fueron montadas sobre soportes metálicos, realizándose un sombreado metálico con oro coloidal obtenido por ionización en una columna metalizadora Balser (SCD 004) con una altura de 6-7 cm, distancia de trabajo adecuada para muestras de tipo orgánico. Se conservaron en una desecadora hasta el momento de su observación en un microscopio Jeol (JSM 6.400) utilizando una tensión de 15 kV y 20 kV.

11.- PURIFICACION TOTAL DE LAS ISOFORMAS DE ARGINASA.

Dos proteínas con actividad arginasa, una de ellas intratalina (ABP) descrita hasta el momento, y la otra segregable (SA) fueron purificadas totalmente hasta homogeneidad tal como se indica a continuación:

11.1. Purificación arginasa intratalina (ABP)

Esta proteína fue pre-purificada de 17 g de talo recién recolectado segun Bubrick et al. (1985), mediante dos precipitaciones con sulfato de amonio (como se indicó en el apartado 2.). La purificación se completó según Planelles y Legaz (1987). La proteína parcialmente purificada fue adsorbida sobre gel de fosfato cálcico (hidroxiapatita) en relación 100 mg de peso seco por cada mg de proteína (Martín-Falquina y Legaz, 1984). La molaridad de los tampones (Tris-HCl, pH 9.15) que se utilizaron para la desorción oscilaba entre 10 y 220 mM. El gel se colectaba por centrifugación a 7.000 g (rotor JA-21) durante 10 min, añadiendose al precipitado el tampón de la siguiente molaridad creciente. Todas las fracciones obtenidas tras la desorción (aproximadamente 60 ml de cada una de ellas) fueron analizadas para determinar su actividad específica arginasa. La fracción con mayor actividad específica (140 mM) fue dializada en agua destilada durante 24 horas y liofilizada. La proteína se resuspendió en 10 ml de tampón Tris-HCl 140 mM (aproximadamente 0.11 mg ml^{-1}) y se filtró por una columna de Sephadex G-150 (36cm x 2.5 cm). El volumen muerto (100 ml) se determinó con azul dextrano 2000 y la columna se equilibró con tampón Tris-HCl 180 mM. La elución se realizó a flujo continuo, tomando fracciones de 10 ml. La fracción que presenta mayor actividad arginasa fue recogida y liofilizada.

11.2. Purificación arginasa segregable (SA)

11.2.1. Determinación del máximo de secreción

Con objeto de realizar la purificación total de arginasa con el mayor rendimiento posible, se valoró el tiempo de secreción máxima de esta actividad enzimática en luz y oscuridad a 26°C de talos incubados en arginina 40 mM (Planelles y Legaz, 1987).

Placas que contenían 1 g de talo en 15 ml de argina 40 mM en Tris-HCl 10 mM pH 9.15 fueron incubadas en luz y oscuridad durante diferentes tiempos. Los medios de incubación se extrajeron cada hora (hasta un máximo de 8 horas) y se dializaron frente a tampón durante 24 horas cambiando el tampón 5 veces. Se valoró actividad arginasa de los dializados según Legaz y Vicente (1980).

11.2.2. Método de purificación de arginasa segregable

15 g de *Xanthoria parietina* recién recolectados fueron incubados en 150 ml de arginina 40 mM en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9.15, durante 1 h a 26°C en oscuridad. La arginasa segregable fue purificada del medio de incubación por precipitación con sulfato de amonio al 50 % (Planelles y Legaz, 1987). El sobrenadante se recogió y a continuación se siguieron los pasos de purificación que se describieron en el apartado 10.1.

11.2.3. Ensayo de azúcares totales

Al igual que con la lectina intratalina parcialmente purificada, 65 mg en 1,0 ml de arginasa segregable fueron sometida a hidrólisis ácida con objeto de verificar si dicha proteína estaba glicosilada. El método se describió en el apartado 3.2.

11.3. Electroforesis en poliacrilamida.

Con objeto de verificar la purificación y obtener el peso molecular de la proteína se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (O'Farrel, 1975) en condiciones nativas y desnaturalizantes con SDS al 0,1%, hirviendo las muestras durante 5 minutos.

A continuación se describe la preparación de los geles:

a) Gel separador

El gel separador se preparó para un volumen final de 20 ml (aproximadamente un gel) añadiendo 7.5 ml de tampón Tris-HCl 1 M, pH 8.8; 4.4 ml de agua destilada; 8×10^{-4} % TEMED; 0.037% persulfato amónico; 12% Acrilamida-Bis acrilamida; 0.1% SDS en los casos de electroforesis desnaturalizante.

b) Gel condensador

Igualmente se preparó para un volumen final de 20 ml (aproximadamente un gel): 1.25 ml de tampón Tris-HCl 1 M, pH; 6.8; 6.9 ml agua destilada ; 0.001% TEMED (v/v) ; 0.04% persulfato amónico (v/v); 5% Acrilamida-Bis acrilamida (v/v); 0.1% SDS (p/v) en electroforesis desnaturalizante.

Las muestras (aproximadamente 20 mg) fueron disueltas en tampón de carga (Tris-HCl 50 mM, pH 6.8) conteniendo 0,7% β -mercaptoetanol (v/v) , 0.1% azul de bromofenol (v/v) y 10% de glicerol (v/v) y sometidas a una corriente eléctrica manteniendo el amperaje constante 20 mA. El tampón utilizado como electrolito fue Tris-glicina 50 mM, pH 8.3.

Los geles fueron fijados en metanol 40%, ácido acético 10% (v/v). Las proteínas se revelaron utilizando tinción de plata (Merril *et al.*, 1981).

12.- CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE AMBAS ISOFORMAS

Para comparar la naturaleza química de ambas proteínas se procedió a la caracterización bioquímica, analizando su peso molecular, punto isoelectrico, aminoácidos, composición de los carbohidratos que constituyen el resto glicosílico y espectro de fluorescencia.

12.1 Electroforesis en poliacrilamida: determinación de pesos moleculares.

Esta técnica ha sido descrita anteriormente. Para determinar el peso molecular se interpoló en una recta patrón construida con proteínas de peso molecular conocido: Carbónico anhidrasa (29 kDa); Ovoalbumina (45 kDa) y Seroalbumina bovina (66 kDa). Todas ellas de Sigma Chem. Co.

12.2. Electroforesis capilar: análisis del punto isoelectrico.

Alícuotas de ambas arginasas, cuya concentración aproximada fue de $65 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ fueron preparadas para su análisis por electroforesis capilar zonal con objeto de determinar su punto isoelectrico. Fueron dializadas frente a agua bidestilada y filtrada por filtros Millipore GS de 0.22 μm de diámetro de poro, liofilizadas y resuspendidas en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,0.(Pedrosa, 1995).

Las condiciones de análisis se especifican a continuación:

a) Características del capilar:

- Tubo de sílice fundida recubierta de poliimida
- Diámetro interno: 75 μm
- Diámetro externo: 190 μm
- Longitud del capilar hasta la ventana de detección 63cm

b) Electrolito

- Tampón borato sódico 25 mM pH 9,0 en agua destilada y filtrada.

c) Condiciones de análisis

- Temperatura: 30°C

- Voltaje aplicado: 17 kV (aprox. 50 mA)
- Tipo de inyección: Hidrodinámica durante 8 s
- Volumen de carga: 36 ml

d) Detección

- UV-"on column" a 200 nm.

El equipo utilizado fue un Spectraphoresis 500 de Spectra Physics. Los electroferogramas se procesaron en un integrador SP 4290 (Spectra Physics). La determinación del punto isoelectrico se realizó mediante la interpolación de los valores de movilidad electroforética en una recta de calibrado construida con proteínas de pI conocido: Mioglobina (pI 7.0); Aldolasa (pI 6.6); anhidrasa carbónica (pI 5.9); Alcohol deshidrogenasa (pI 5.4) y tiroglobulina (pI 4.6). Todas ellas de Sigma Chem Co. Como marcador neutro se utilizó benzol (Carlo Erba al 4% v/v) en el electrolito de análisis.

La movilidad electroforética (m_e) se define como:

siendo L: longitud del capilar

t_m : tiempo de migración

V: Voltaje aplicado

12.3. Análisis de aminoácidos

80 mg de proteína de ambas isoelectinas previamente dializadas en agua bidestilada y filtrada fueron utilizadas para realizar los análisis de su composición de aminoácidos. Controles de 80 mg y 250 mg de lisozima de clara de huevo (Sigma Chem. Co.) fueron preparados de forma paralela para controlar el proceso.

Las muestras fueron tratadas según el método de Gavilanes *et al.* (1982). Las proteínas fueron liofilizadas y disueltas en 0.2 ml de HCl 6 N conteniendo fenol 0.1% (p/v) y 20 nmol×ml⁻¹ de nor-leucina como patrón interno. La hidrólisis se llevó a cabo a 105°C en ampollas herméticas durante 24h. Los hidrolizados se secaron en corriente de aire, añadiéndoles después 200 ml de agua destilada y secando posteriormente. Este proceso de lavado se repitió 2 veces. Las muestras fueron procesadas en un analizador de aminoácidos Beckman System 6300 con un módulo de interfase analógica (System Gold). El tiempo de análisis fue de 65 min.

Los restos Cys se valoraron mediante oxidación con ácido per fórmico (Hirs, 1967). La preparación del ácido per fórmico se realizó mezclando agua oxigenada (30 volúmenes) con ácido fórmico al 99% en relación 1:9. Se dejó a 25°C durante 2 horas y media y se mantuvo a -10°C al menos durante 15 minutos.

Las muestras se preparan con 12.5 ml de ácido fórmico al 99%, comprobando que se disolvieron y manteniéndolas en un baño con hielo. La oxidación se realizó añadiendo 15 ml de ácido per fórmico a las muestras de 80 mg y 47 ml del mismo ácido a las muestras de 250 mg. La reacción se mantuvo a -10°C durante 2 horas y media. A continuación las muestras se lavaron y liofilizaron diluyendo al menos 30 veces con agua destilada. Por último, las muestras se sometieron a hidrólisis ácida durante 24 horas como se indicó anteriormente.

Los residuos Tryp fueron determinados en relación con los residuos de Tyr del análisis anterior mediante lectura espectrofotométrica (Beaven y Holiday, 1952). Se disolvieron 80 mg de proteína en 1

ml de NaOH 0.1N, comprobando que la absorbancia a 280nm estaba comprendida entre valores 0,2-0,5. En este caso se midió la absorbancia a 294,4 y 280 nm calculándose el número de moles de Tryp por molécula de proteína en función del número de moles de Tyr por molécula (Beaven y Holiday, 1952).

12.4 Análisis de azúcares del resto glicosídico por HPLC

12.4.1. Hidrólisis ácida y extracción de azúcares

Muestras de 40 mg de arginasas purificadas fueron hidrolizadas con 0,5 ml de HCl durante 2h a temperatura ambiente en cápsulas herméticas (Planelles y Legaz, 1987). Las muestras fueron secadas en corriente de aire y los residuos disueltos en 1.0 ml de etanol frío al 80% (v/v) y almacenados a -20°C durante 14 horas. Las muestras se calentaron a 60°C durante 20 min y se llevaron a sequedad. Este proceso se repitió 3 veces en las mismas condiciones. El último residuo se reconstituyó con 1,0 ml de etanol frío 80% y se centrifugó a 13.000 g durante 15 min a 2°C (Legaz *et al.*, 1985). El sobrenadante se evaporó hasta sequedad y se resuspendió en 200 ml de agua destilada y filtrada para posterior análisis en Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Muestras de 40 mg de fetuina (Sigma Chem. Co.), una proteína glicosilada cuya composición de monosacáridos estaba previamente definida fue hidrolizada de la misma forma con 5 ml de HCl 6 N con objeto de verificar la validez del método y que la cuantificación de monosacáridos de las lectinas había sido realizada sin destrucción por HCl. La composición de los restos glicosilados de la fetuina era galactosa, manosa, glucosamina y ácido siálico (Spiro, 1960) además del ácido N-acetil-neuramínico, el cual está ligado a un residuo de N-acetil-galactosaminitol (Spiro *et al.*, 1974).

12.4.2. Purificación de patrones

Los patrones utilizados fueron: D-fructosa, D-fucosa, D-glucosa, D-galactosa y D-manosa; D-glucosamina, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina y ribitol como polialcohol, todos ellos de Sigma Chem. Co. El acetonitrilo utilizado en la fase móvil procedía de Carlo Erba (grado HPLC). Una columna Micropack NH₂ (Varian) suplementada con hexano para utilizar en fase normal fue preparada para analizar azúcares en fase reversa (Vicente *et al.*, 1991).

Muestras de 5,0 ml (8 mg×ml⁻¹) de solución patrón disueltas en agua bidestilada y filtrada fueron aplicadas en una columna de alúmina neutra (11,0 cm x 1,0 cm) para cromatografía tipo WN-3 (Sigma Chem. Co.). La columna fue equilibrada con agua bidestilada y filtrada, utilizándose ésta como fase móvil. Las fracciones eluidas (5,0 ml) fueron analizadas con objeto de verificar el contenido de azúcares tal como se indicó en el apartado 3.2. (Dubois *et al.*, 1956). La fracción que contenía la mayor cantidad del correspondiente azúcar fue secada en corriente de aire. Se siguió el mismo proceso de extracción que las muestras y el residuo se preparó para su análisis por HPLC. Fracciones purificadas de glucosa y galactosa fueron identificadas por acción de enzimas específicas. Aliquotas de 0,5 ml de la fracción más concentrada del correspondiente monosacárido fueron incubadas durante 30 min. a 30°C con 1,0 mg de glucosa oxidasa (Raabo *et al.*, 1960) o 1.0 mg de galactosa oxidasa (Avigad *et al.*, 1962), 0,5 mg de peroxidasa y guaiacol. El incremento de absorbancia se midió a 475 nm.

12.4.3. Condiciones de análisis

El cromatógrafo utilizado en este análisis fue un Varian Modelo 5060 equipado con un detector Spectra System UV 2000 y un integrador Vista CDS 401 (Varian). Las condiciones fueron las siguientes:

a) Condiciones cromatográficas

- Columna MicroPack NH₂ 10p/N (30,0 cm x 3,0 mm) de Varian
- Fase móvil: acetonitrilo:agua (80:20, v/v).

- Flujo: $1,0 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$
- Temperatura: 20°C
- Presión: 50 atm
- Condiciones isocráticas
- Patrón interno: $2,0 \text{ mg ml}^{-1}$ ribitol
- Volumen de inyección: 10 μl
- Tiempo de análisis: 10 min

b) Condiciones de integración

- Atenuación: 64

c) Condiciones de detección

- Detección en ultravioleta a 195 nm
- U.A.F.E: 0,002

La cuantificación fue realizada por inyección de diferentes cantidades de patrón filtrado a través de la columna de alumnina, estimando dicha concentración según Dubois *et al.*, (1956) tras interpolar los valores de absorbancia en las rectas patrón correspondientes. El calibrado indirecto se llevó a cabo utilizando ribitol como patrón interno.

12.5 Espectros de fluorescencia

Espectros de fluorescencia de ABP y SA se realizaron utilizando un espectrofluorímetro Kontron, modelo SFM 25, equipado con un fotomultiplicador de referencia. El equipo poseía una lámpara de xenon con una rendija de excitación y emisión de 15 y 10 nm respectivamente. Las cubetas de cuarzo presentaban sus 5 caras pulimentadas. Los análisis se llevaron a cabo a temperatura ambiente y la concentración de las proteínas fue de $33,6 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ y $71,0 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ para ABP y SA, respectivamente. Las muestras disueltas en tampón Tris-HCl 140 mM y tampón Tris-HCl de la misma

molaridad fueron dializadas frente a agua durante 24h. El tampón dializado fue utilizado para realizar la corrección de línea base.

Los espectros se registraron entre 270 y 500 nm utilizando como velocidad de barrido 50 nm×min⁻¹. La longitud de onda de excitación fue de 257 nm puesto que esta longitud ofrecía el espectro más amplio (Pedrosa, 1993).

13.- AFINIDAD ENTRE LECTINAS Y EL RECEPTOR UREASA

13.1. Análisis de afinidad por fluorimetría

Espectro de absorbancia y fluorescencia de SA fluoresceína fueron realizados utilizando un espectrofluorímetro SFM-25 Kontron equipado con cubetas de cuarzo. La longitud de onda de emisión fue de 470 (máximo de absorbancia) y el máximo de emisión de fluorescencia fue de 490 nm. Estas longitudes de onda se utilizaron en los posteriores análisis. Las unidades relativas de fluorescencia se consiguieron por sustracción de la obtenida en controles tratados sólo con el fluorógeno.

41 mg de proteína (SA o ABP) fueron marcadas con fluorescencia como se indicó en el apartado 4.1. y dializadas frente a agua destilada durante 24 horas cambiando el tanque 4 veces. Después de esto, fotobiontes recién aislados (Ascaso, 1980) e inducidos con urea 100 mM durante 4h en tampón fosfato 75 mM, pH 6.9 fueron incubados con las proteínas marcadas durante 3h a 26 °C en oscuridad. Tras la incubación, las células se lavaron en tampón y se centrifugaron a 27.000 g durante 20 min a 2°C.

Aquellas células preincubadas con ABP marcada fueron incubadas con SA no marcada mientras que aquellas que tenían unidas a su receptor SA marcada fueron incubadas con ABP no marcada. Ambas incubaciones se realizaron durante 3h a 26°C en agitación y oscuridad. El medio de

incubación se recogió por centrifugación a 27.000g durante 20 min a 2°C y se midió la emisión de fluorescencia relativa a 490 nm.

13.2. Análisis de afinidad por microscopía de fluorescencia

Algas aisladas de 10 g de talo fresco fueron incubadas con urea 100 mM durante 4h a 26°C. Tras el lavado en tampón PBS pH 7.4, dos alícuotas de suspensión algal (5,0 ml) fueron incubadas durante 3h a 26°C con 41 mg de SA marcada o con ABP marcada con el fluorocromo. Una alícuota (2,5 ml) se incubó nuevamente con las proteínas sin marcar, como se indica en el ensayo anterior. Las células usadas en los cuatro análisis fueron recogidas por centrifugación y lavadas abundantemente con tampón PBS. Preparaciones frescas de las células fueron observadas en un microscopio de fluorescencia Axioskop Zeiss-MC-80 (West Germany) y fotografiadas mediante exposición automática utilizando una película Agfachrome 100 ASA. Se contabilizó el número de células con fluorescencia roja y amarilla, realizando los pertinentes análisis estadísticos.

14. ANALISIS DE POLIAMINAS EN FOTOBIONTES

Con objeto de valorar el efecto de la entrada de isoelectinas arginasa en la ruta de síntesis de poliaminas en el interior celular se realizaron los siguientes tratamientos:

14.1. Tratamientos previos en el fotobionte

Un gramo de talo liquénico fue utilizado para cada ensayo a partir del cual se extrajeron los fotobiontes, que se resuspendieron 7 ml de tampón PBS. Los doce ensayos se describen a continuación:

En seis de los ensayos las algas fueron incubadas en 5,0 ml de arginina 28 mM (Legaz et al, 1986) durante 30 min a 26°C en obscuridad en continua agitación y posteriormente lavadas en PBS durante 10 min a 10.000 g. Tres de los cuales fueron incubados en 5,0 ml de urea 100 mM durante 4h a

26 °C en agitación con objeto de inducir el receptor. Uno de estos se incubó con 68 mg de ABP (7,0 ml), otro con 68 mg de SA (7,0 ml) y el último sirvió de control. La reacción se llevó a cabo durante 3h a 26°C en obscuridad. En los otros 3 ensayos las algas no fueron sometidas a inducción del receptor y fueron incubadas directamente con las lectinas tal como se describe anteriormente.

En los otros seis ensayos, las algas no fueron suplementados con el aminoácido. De éstos, en tres las células fueron inducidas con urea e incubadas posteriormente con ABP o SA (68 mg en 7,0 ml de tampón). También fue preparado un control sin proteína. Por último, en los otros tres ensayos, las algas no fueron sometidas a inducción del receptor en pared, incubándose después con las isolectinas tal como se indicó anteriormente. También fue preparado un control no tratado.

Tras los tratamientos, las células se lavaron con tampón y se recogieron por centrifugación a 10.000 g durante 15 min a 2°C. La pella se congeló durante toda la noche a -20°C para posteriormente extraer las poliaminas.

14.2. Extracción de poliaminas

El proceso de extracción aparece en el esquema (Esq. 3.) y se realizó de acuerdo con Escribano y Legaz, (1988). Las células fueron maceradas con 5% de ácido perclórico (PCA, p/v) el cual contenía n-butilamina 5 mM como patrón interno. Esta suspensión fue almacenada toda la noche a 4°C en tubos de plástico y posteriormente centrifugada a 48.000g durante 20 min a 2°C.

El precipitado fue lavado 4 veces con ácido perclórico 5% y neutralizado con NaOH 1 N, añadiendo patrón interno a una concentración de 5 mM en PCA al 5% (p/v). Las muestras se agitaron y se dejaron reposar toda la noche a 4°C. A continuación, se realizó una hidrólisis ácida con HCl 12 N durante 18 horas a temperatura ambiente. El hidrolizado se secó en corriente de aire a 70°C y se resuspendió en PCA al 5% frío para su posterior centrifugación a 12.000 g durante 15 min. El sobrenadante se secó en corriente de aire a 70°C y se almacenó para su análisis por HPLC. Esta

fracción correspondía a las poliaminas conjugadas a macromolécula e insolubles en ácido (Fracción PH).

El primer sobrenadante contiene las poliaminas libres (Fracción S) así como las poliaminas conjugadas solubles en ácido (Fracción SH. La mitad del volumen del sobrenadante se almacenó a -20°C para su posterior derivatización y análisis por HPLC. El resto del volumen se trató para extraer las poliaminas solubles en ácido mediante hidrólisis ácida con HCl 12 N, relación 1:1 (v/v). La hidrólisis se mantuvo durante 18 horas a temperatura ambiente. Esta fracción (S+SH) se secó de igual forma que la fracción PH y se almacenó a -20°C hasta su derivatización.

14.3. Derivatización de las poliaminas

El proceso de derivatización se muestra en el esquema (Esq. 4.). Una alícuota de 0.2 ml de extracto en PCA 5% fue dansilada con 0.4 ml de cloruro de dansilo ($20 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ en acetona grado HPLC) en presencia de CO_3Na_2 saturado. Tras agitación durante 30 min, se dejó en reposo durante 16h a temperatura ambiente en oscuridad. Se añadió 0.1 ml de prolina y se agitó durante 30s, dejándolo en reposo 30 min con objeto de eliminar el exceso de cloruro de dansilo. Las muestras fueron tratadas con tolueno (3,0 ml), agitando 30 s y dejando decantar durante 15 min. El proceso se repitió dos veces y la fase orgánica se recuperó y secó en corriente de aire a 4°C. Se adicionaron 600 ml de metanol potasa 28,5 % (p/v) a las muestras, incubándolas a 50°C durante 45 min. Después, 1,5 ml de una mezcla acuosa de fosfatos (20g PO_4HNa_2 + 20g $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ hasta 150 ml de agua destilada) se incorporaron al ensayo. Posteriormente, se extrajo con tolueno tal como se indicó anteriormente. La fase orgánica se secó a 40°C, disolviendo el residuo seco en 1,0 ml de metanol (grado HPLC) para su posterior análisis.

14.4 Análisis de poliaminas

Las poliaminas fueron analizadas por HPLC en fase reversa de acuerdo con el método descrito por Escribano y Legaz, (1988).

a) Condiciones cromatográficas

- Columna: Micro-Pack MCH-5N cap Varian (15 cm x 4 mm).

- Fase móvil: Gradiente de concentraciones

Fase A: Metanol grado HPLC

Fase B: Agua bidestilada y filtrada (Millipore GS)

- Flujo: Gradiente de flujo entre $0,7 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ y $1,5 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$

- Presión: máxima: 130 atm

mínima: 66 atm

- Volumen de inyección: 10 μl

- Tiempo de análisis: 30 min

b) Condiciones de integración

- Atenuación 32

c) Condiciones de detección

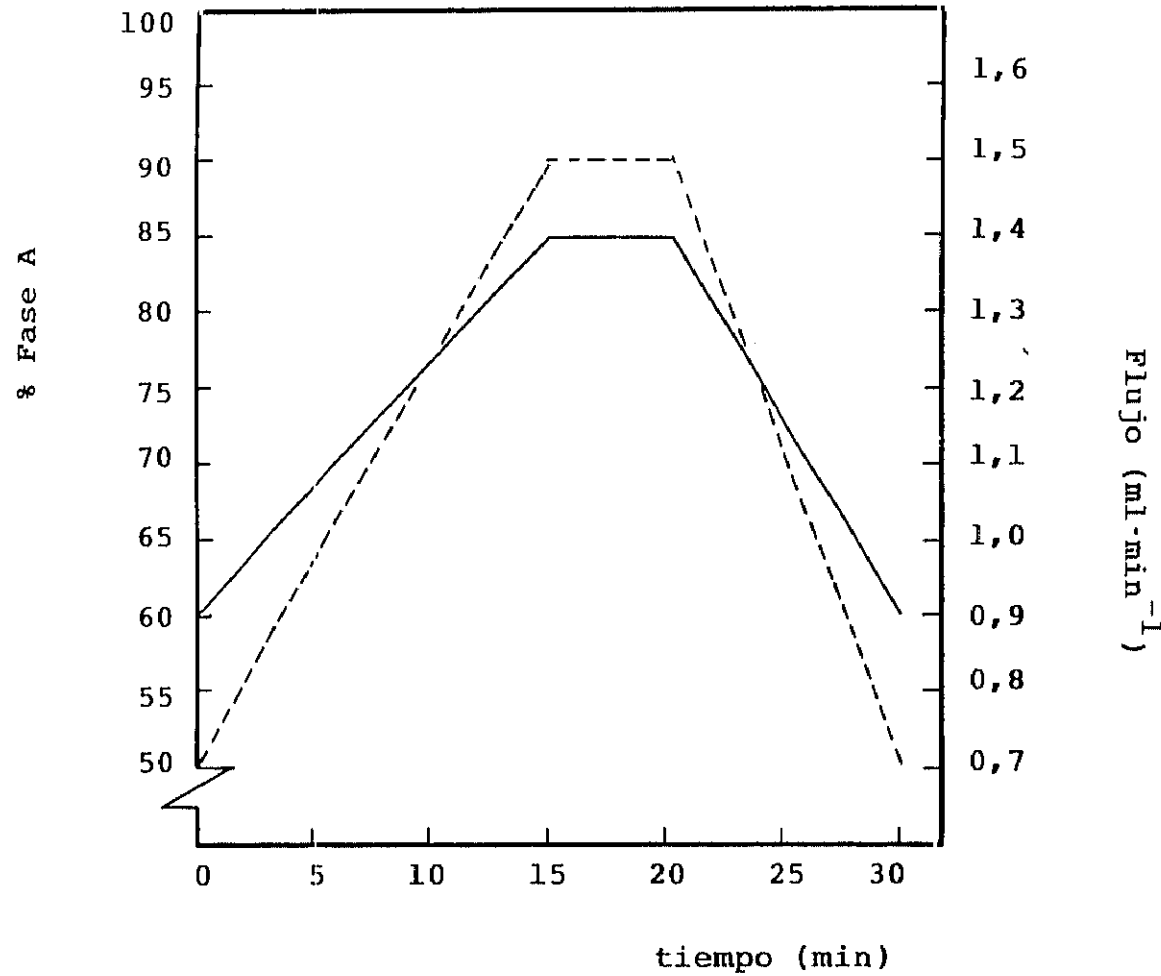
- Emisión de fluorescencia

- U.A.F.E.: 0,002

La fase móvil fue sometida a un gradiente lineal de concentración que oscilaba desde 60% de fase A a tiempo cero hasta un 85% de la misma fase a los 15 min de análisis, manteniéndose esta proporción durante 5 min más a partir de los cuales se inició el contragradiente hasta los 30 min de análisis (Fig. 2.). La cuantificación de poliaminas se realizó interpolando los valores de cuentas de area relativas sobre una recta patrón de putrescina, espermidina y espermina utilizando concentraciones crecientes de dicha poliaminas, verificando la respuesta lineal del detector.

Fig. 2. Análisis de poliaminas de HPLC en fase reversa.

Gradiente de flujo de la fase móvil (---). Gradiente de concentración de la fase móvil en función del porcentaje de fase A respecto al total (—). Según Escribano y Legaz (1988).



El gradiente de flujo comenzó con un valor de $0,7 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ incrementándose hasta $1,5 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ en los primeros 15 min de análisis y conservándose durante 5 min más. A partir de este tiempo, se inició el contragradiante de forma que las condiciones de análisis fueron las mismas que las iniciales.

15.- ANALISIS DE CLOROFILAS POR HPLC

Se valoró por HPLC la degradación de clorofilas en fotobiontes así como de clorofila exógena. Los tratamientos a los que fueron sometidos los fotobiontes fueron los indicados en el apartado anterior para el análisis de poliaminas.

15.1. Extracción de clorofilas endógenas

Tras los tratamientos, las algas fueron recogidas por centrifugación a $10.000g$ durante 10 min, congeladas y maceradas con alúmina tipo A-5. El macerado se resuspendió en 4 ml de acetona 80 % durante 30 min (3 veces) y se centrifugó a $10.000g$ durante 10 min, extrayendo la fase orgánica. Una segunda extracción se realizó con 4 ml de éter de petróleo durante 48 horas. Ambas fases se unieron y secaron en corriente de aire. El residuo seco se almacenó a -20°C no más de 24 horas para su posterior análisis por HPLC.

Algas recién aisladas fueron también incubadas con putrescina (Sigma Chem. Co.) en tampón fosfato 10 mM pH 7.0 durante 3h a 25°C . El proceso de extracción fue el indicado anteriormente.

En todos los casos, 0,5 ml de extracto libre de células fue reservado para valorar proteína (Lowry *et al.*, 1951).

15.2. Análisis de clorofilas por HPLC

Las clorofilas se valoraron por HPLC de fase reversa de acuerdo con Canjura y Schwartz, (1991).

a) Condiciones cromatográficas

- Columna Micro-Pack MCH-5n cap Varian (15 cm x 4 mm).

- Fase móvil: Gradiente de concentraciones

Fase A: Acetato de etilo:metanol:agua (15:25:20,
v/v)

Fase B: Acetato de etilo:metanol:agua (60:30:10,
v/v)

- Flujo: Gradiente de flujo entre 1,3 y 1,5 ml×min⁻¹

- Temperatura: 25°C

- Presión máxima: 170 atm

- Presión mínima: 10 atm

- Volumen de inyección 10 µl

- Tiempo de análisis: 50 minutos

b) Condiciones de integración

- Atenuación 64

c) Condiciones de detección

- Detección por absorbancia a 665 nm

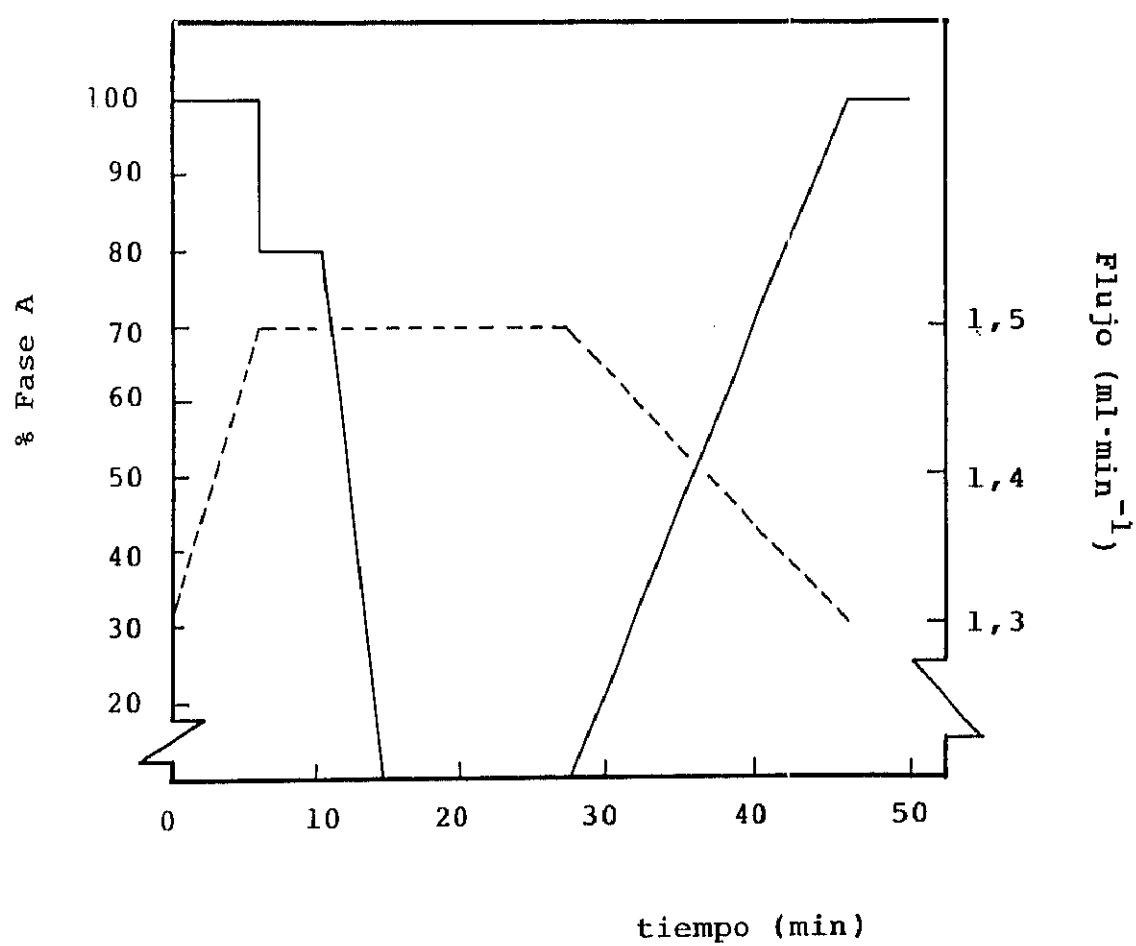
- U.A.F.E.: 0,002

El gradiente comenzó con un flujo de 1,3 ml×min⁻¹ utilizando como fase móvil 100% fase A hasta los 6 minutos de análisis. El flujo se modificó a este tiempo a 1,5 ml×min⁻¹ manteniendo constante la fase móvil hasta el minuto 7 de análisis, cuando se incorporó un gradiente de concentraciones, incrementando el porcentaje de la fase B hasta 100% a los 14.5 minutos de análisis (Fig. 3). Estas condiciones se mantuvieron hasta el minuto 25,5, tiempo al cual comenzó el contragradiente de manera que al final del análisis la condiciones fueran iguales que la iniciales (Fig. 3).

Fig. 3. Análisis de clorofilas por HPLC en fase reversa. Gradiente de flujo de la fase móvil (- - -).

Gradiente de concentración de la fase móvil en función del porcentaje de fase A respecto al total —

Según Canjura y Schuwartz (1991) con modificaciones.



El cromatógrafo utilizado en este análisis fue un Varian Modelo 5060 equipado con un detector Spectra Physics UV 2000 y un integrador vista CDS 401 (Varian).

16. ENSAYOS DE LIGAMIENTO ISOLECTINA-RECEPTOR.

16.1. Unión isoelectinas a eritrocitos. Hemaglutinación.

30 μ l de cada isoelectina disueltas en suero salino (Lockhart *et al.*, 1978) se incubaron con 30 ml de sangre humana del grupo B- y observada en un microscopio de luz blanca Labophot Nikon (Japan). Controles preparados en suero salino también fueron preparados. La emulsión fotográfica utilizada para realizar las fotomicrografías fue Plus-X-Pan 125 ASA.

16.2. Unión isoelectinas-receptor. Valoración de actividad ureasa en pared

Fotobiontes recién aislados de 6,0 g de liquen *Xanthoria parietina* (Ascaso, 1980). Una alícuota de 1,0 ml de fotobiontes resuspendido en tampón PBS fue preincubada en urea 100 mM durante 4h mientras otra alícuota del mismo volumen fue incubada en tampón sin inductor. También fueron preparados un control no tratado y otro únicamente incubado con urea. Tras la preincubación las algas fueron lavadas y cultivadas durante 3h con las isoelectinas aisladas (ABP y SA) a una concentración de 30 $\text{mg} \times \text{ml}^{-1}$ (volumen final) en tampón PBS, en oscuridad, agitación constante y 26°C. Tras la incubación, se centrifugaron durante 15 min a 10.000 g y se aislaron las paredes celulares (Legaz y Vicente, 1989). Las paredes se resuspendieron en 2.5 ml de tampón fosfato 75 mM, pH 6.9 y se procedió a la valoración de actividad ureasa (Conway, 1962) y la estimación de proteínas (Lowry *et al.*, 1951) tal como se indicó en el apartado 5.4.

16.3. Unión isoelectina-receptor de fotobionte. Observación Microscópica.

Alícuotas de 0,5 ml de los ensayos anteriores fueron utilizadas para preparar muestras en fresco y observarlas al microscopio de luz blanca (Labophot Nikon AFX-IIA). Los mismos ensayos se repitieron en un medio isotónico que contenía sorbitol 1,2 M (Ahmadjian, 1987). Los resultados se recogieron en una película fotográfica Plus-X-Pan 125 ASA mediante un sistema electrónico de exposición.

16.4. Valoración de actividad glucanasa intracelular

Ensayos paralelos a los anteriores permitieron valorar la actividad glucanasa intracelular. Tras los tratamientos anteriormente expuestos, las células fueron recolectadas por centrifugación y lavadas en tampón acetato sódico 10 mM, pH 3,5. Posteriormente, se obtuvo el extracto libre de células por macerado de las mismas con alumina neutra Tipo A-5. Un mililitro de cada extracto fue utilizado para valorar actividad glucanasa. El medio de reacción contenía 1,0 ml de carboximetilcelulosa 1% (Fluka AG) en tampón acetato, 1,0 ml del extracto y 1,0 ml de tampón acetato. Controles paralelos fueron preparados. El proceso transcurrió a 37°C en agitación durante 5 horas. Una vez detectada la reacción por incremento colorimétrico a 540 nm (Somogyi, 1952 revisado por Nelson, 1944) se estimó la concentración de azúcares reductores por interpolación en una recta patrón. La valoración de proteínas se realizó por el método de Lowry *et al.*, (1951). La actividad específica se definió como 1,0 mmol de glucosa producido por min y mg de proteína.

Incorporando 1,0 ml de sorbitol 1,2 M al medio de reacción y una concentración conocida (1,0 mg ml⁻¹) de glucanasa comercial (Sigma Chem. Co.) se comprobó el efecto de este isotónico sobre la actividad glucanasa.

16.5. Efecto de la putrescina sobre la actividad glucanasa

16.5.1. Actividad glucanasa de un preparado comercial

El medio de reacción se preparó conteniendo 0.5 ml de glucanasa (Sigma Chem Co.) 1,0 mg ml⁻¹ en agua destilada, 1 ml de CMC al 1% (p/v) en tampón acetato, 0,5 ml de putrescina a distintas concentraciones (0mM, 1mM, 3mM, 5mM, 7mM y 10mM, volumen final) en tampón acetato. La poliamina se mantuvo en contacto con la enzima durante 15 min a 26°C en agitación. La reacción ocurrió a 37°C durante 2h y fue interrumpida con 1,0 ml de NaOH 3% y detectada con 0,3 ml de dinitrosalicílico tras hervir las muestras 10 min y medir absorbancia a 540 nm (Sumner, 1921).

16.5.2. Actividad glucanasa intracelular

En este caso, la glucanasa comercial fue sustituida por un extracto libre de células obtenido de fotobiontes recién aislados de 3,0 g de *Xanthoria parietina*. El tiempo de reacción fue de 5 horas y media. La actividad glucanasa específica se valoró como en el apartado anterior. La concentración de proteínas se determinó por Lowry *et al.*, (1951).

17.- METODO DE AISLAMIENTO Y CULTIVO *IN VITRO* DEL FOTOBIONTE.

Parte de la experimentación se realizó con fotobiontes mantenidos en cultivo axénico aposimbionte durante dos meses. Los métodos y materiales de esta técnica se describen a continuación.

17.1. Preparación del medio de cultivo

Solución madre A:

1) NaNO_3 (2,5 g), 2) $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,25 g), 3) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,75 g), 4) K_2HPO_4 (0,75 g), 5) KH_2PO_4 (1,75 g), 6) NaCl (0,25 g) añadiendo agua destilada hasta 100 ml en cada una de las seis disoluciones.

Solución madre B:

1) H_3BO_3 (1,142 g), 2) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,438 g), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,882 g), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,144 g), 3) MnO_3 (0,071 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,157 g), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,049 g), 4) EDTA (5,0 g), KOH (3,1 g).

Todas las disoluciones se completaron con agua destilada hasta 100 ml a excepción de la 2) que fue completada con una disolución de ácido sulfúrico al uno por mil en agua destilada.

La preparación del medio (Devon y Bold, 1960) se llevó a cabo tomando 10 ml de cada una de las disoluciones A y 1,0 ml de cada una de las disoluciones B y completando hasta un litro con agua destilada. Se añadieron 40 g de "extracto de suelo" se esterilizó a 121°C y 1 atm durante 20 min (BBM-líquido). Por último, 20 g de agar-agar (Merck, para microbiología) se mezclaron y agitaron fuertemente esterilizando el medio como se indicó anteriormente. El medio se añadió a placas petri y se dejó solidificar (BBM-sólido).

17.2. Preparación del extracto de suelo

El extracto de suelo se preparó según Esser, (1976). 500 g de suelo del area próxima a donde fue recogido el liquen se sumergieron en 2 litros de agua destilada y se esterizaron durante 2h a 80°C . A continuación, se filtró la suspensión y se volvió a esterilizar. La disolución madre se preparó tomando 100 ml de extracto y añadiendo 400 ml de agua bidestilada. Inmediatamente antes de su uso se volvió a esterilizar.

17.3. Aislamiento del fotobionte

El aislamiento de los fotobiontes se realizó mediante el método de la micropipeta (Ahmadjian 1967;1993).

Los talos de *Xanthoria parietina* fueron rehidratados durante 20 min y lavados en tampón PBS durante 1h (Bubrick *et al.*, 1985). A continuación, se lavaron con agua bidestilada y estéril (121°C, 1 atm, 20 min) durante 1 hora en agitación.

Los podocios se limpiaron por observación a la lupa obteniendo fragmentos de aproximadamente 2mm². Los fragmentos fueron macerados entre dos portas de vidrio estériles en una cámara de flujo laminar. La suspensión celular se inoculó con una micropipeta en medio BBM (Devon y Bold, 1960). Las placas fueron cerradas de forma no hermética y trasladadas a la cámara de cultivo cuyas condiciones se especifican a continuación: temperatura 20°C; fotoperiodo 12 horas luz: 12 horas oscuridad, intensidad de luz 60-100 mE m⁻²×s⁻¹ con lámparas Philips 65W/29RW (Stocker-Wörgötter y Türk, 1991).

17.4. Aislamiento del micobionte

Como dato adicional se aisló y cultivo también el micobionte de *Xanthoria parietina* con objeto de determinar la viabilidad del micobionte aislado del autofotosimbionte. Este proceso se llevó mediante esporulación invertida en placa Petri (Ahmadjian, 1961) utilizando como medio de cultivo LBM medio al 4% de glucosa (Lilly and Barnett, 1951).

18.- ESTUDIO MORFOLOGICO DE LOS CULTIVO

Con objeto de aproximarnos al estado fisiológico de los cultivos así como determinar los diferentes estadios del desarrollo del fotobionte de *Xanthoria parietina* se prepararon muestras en

fresco de trebouxoides cultivados durante dos meses como se indicó en el apartado anterior. Las muestras fueron observadas en luz blanca y luz polarizada (interferencia de fase). La observación microscópica se realizó utilizando un microscopio de luz blanca Reichert Polyvar que disponía de objetivos y condensador, así como de un prisma de Nikol para observación con luz polarizada. La exposición fotográfica se realizó por un sistema de flash automático fijado a las lentes. La película utilizada fue Kodak T-Max 100 ASA.

19.- ENSAYO DE LIGAMIENTO DE ISOLECTINAS EN CULTIVOS

19.1. Tratamiento previo y observación microscópica

Dos isolectinas con actividad arginasa en concentración $31 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ (volumen final) fueron purificadas tal como se indicó en el apartado 11. Posteriormente se marcaron con fluoresceína (apartado 4.1.) y se incubaron durante 30 min a 26°C , en agitación y oscuridad con fotobiontes cultivados (aproximadamente 10 mg peso seco) que habían sido pre-incubados en urea 100 mM durante 4h tampón PBS pH, 7.4. o con fotobiontes no inducidos. También fue preparada para observación una alícuota de fotobiontes no tratados o incubados únicamente en urea. Tras posterior lavado con tampón PBS fueron preparadas en fresco en un microscopio de fluorescencia Reichert Univar. Las muestras fueron fotografiadas mediante sistema electrónico con una película color agfacrome 100 ASA. En paralelo, estos ensayos fueron observados en luz blanca y luz polarizada como se describe en el apartado anterior.

Por último, fue realizada una cuantificación numérica de células con diferente fluorescencia referida en porcentaje.

19.2. Unión isoelectinas-receptor. Detección enzimática.

Las muestras fueron congeladas a -20°C . Posteriormente se aislaron paredes celulares (Legaz y Vicente, 1989) y se valoró la actividad ureasa de las mismas tal como se indicó en el apartado 5.4.

20. TRATAMIENTOS ESTADISTICOS

Se calculó en todos los análisis realizados la media aritmética (valor representado o dato numérico) y la desviación típica (indicada mediante número en las tablas o barras en las representaciones gráficas).

El ajuste de las rectas de calibrado o patrón se realizó por el método de mínimos cuadrados.

En las distribuciones no paramétricas se realizó un análisis estadístico aplicando χ^2 de contingencia o de heterogeneidad estableciendo previamente el nivel de significación en el 99%. ($p < 0.01$).

RESULTADOS

I. LECTINA INTRATALINA Y SU RECEPTOR DE PARED

I. LECTINA INTRATALINA Y SU RECEPTOR DE PARED

Se detallarán inicialmente los resultados fisiológicos y bioquímicos particulares de la lectina parcialmente purificada así como de su receptor de pared. La purificación y caracterización de una arginasa intratalina y otra segregable al medio permitirá comparar la naturaleza química de estas proteínas como isolectinas o isoformas de una misma enzima, así como discutir los resultados de su posible papel fisiológico. Por último, se describirán los resultados obtenidos en relación con el cultivo axénico de fotobionte.

1.-PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LA LECTINA

INTRATALINA

La proteína descrita por Bubrick *et al.*, (1985) fue purificada parcialmente tal como se indicó en el apartado 2 (Material y Métodos). El extracto libre de células (100 ml) fue llevado a saturación al 40% (p/v) con sulfato de amonio obteniéndose una mayor actividad arginasa en el sobrenadante. Este se saturó al 60% con sulfato de amonio, comprobando que la proteína descrita que se recogía en el precipitado presentaba actividad arginasa. La actividad específica de la proteína fue de 4.73 unidades con un rendimiento del 6.61% en la purificación. La proteína obtenida en este proceso fue purificada 2.95 veces.

Mediante el ensayo enzimático se pudo comprobar que la proteína descrita tradicionalmente como una lectina se comportaba como una proteína con actividad arginasa. Dicha proteína fue entonces eluida de una columna de Sephadex G-150 con tampón PBS a flujo continuo. Las fracciones eluidas fueron utilizadas para valorar cantidad de proteína y actividad arginasa. Como se observa en la Fig. 4 se obtuvieron dos máximos. Uno de ellos correspondía a una proteína con actividad arginasa (0,35 unidades) que eluía en el volumen muerto y que, por tanto, tenía un peso molecular superior a 150 kDa. La evaluación de azúcares totales en esta fracción, tras hidrólisis ácida, hacía sospechar la naturaleza no glicosilada de la misma. Entre las fracciones 60-80 eluyó una proteína con actividad arginasa (1,6 unidades). La proteína aparecía glicosilada. La fracción con mayor concentración de azúcares fue también aquella que mostró una mayor cantidad de proteínas. La valoración cuantitativa de azúcares se hizo por interpolación de los valores de absorbancia en una recta patrón de glucosa (Fig. 5).

Por tanto, la proteína parcialmente purificada y definida como lectina se resolvió por cromatografía de exclusión molecular por Sephadex G-150 en dos isoformas de arginasa constitutiva, una de ellas de elevado peso molecular y de naturaleza no glicosilada que eluía en el volumen muerto en

una única fracción y otra de naturaleza glicoproteica, con una elevada actividad arginasa, que eluía entre las fracciones 60-80 ml.

2.- DETERMINACION DE ACTIVIDAD UREASA EN PARED CELULAR DEL FOTOBIONTE

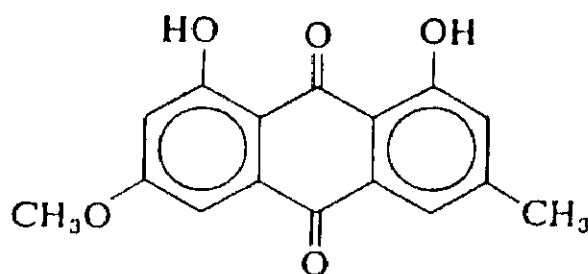
Fotobiontes de *Xanthoria parietina* fueron aislados en gradiente de IK-sacarosa e incubados durante tiempo variable en distintas concentraciones de urea. Se aislaron las paredes celulares y se estimó su actividad ureasa.

La Fig. 6 muestra la curva de velocidad de reacción (Fig. 6.A) así como la actividad específica (Fig. 6.B) a distintas concentraciones del inductor, en función del tiempo de incubación. Como se observa (Fig. 6A), la velocidad de reacción máxima se alcanzaba a concentraciones de 40 y 100 mM de urea tras 6 y 2 horas de incubación, respectivamente. La curva de actividad específica muestra un máximo cuando los fotobiontes fueron inducidos con urea 100 mM durante 4h (Fig. 6.B).

Aquellos fotobiontes que no fueron incubados en presencia de inductor sólo mostraron actividad ureasa en paredes celulares tras dos horas de incubación en tampón fosfato 75 mM pH 6,9. En estas condiciones, tanto la velocidad de reacción como la actividad específica tomaron valores máximos a las 6 horas de incubación. La actividad específica ($3,5 \times 10^{-3}$ unidades) fue 3,7 veces menor respecto a la actividad máxima observada (131×10^{-3} unidades).

2.1. Efecto de la parietina

La parietina es una antraquinona, fenol mayoritario en el liquen *Xanthoria parietina*. Tras purificar dicho fenol como se indico en el apartado 5.5.1. (Material y Métodos), se realizó un espectro de absorbancia entre 250 y 700 nm.



Parietina

La parietina presenta dos máximos de absorbancia, uno de ellos en el espectro visible, a 430 nm y el otro en el ultravioleta, a 280 nm (Fig. 7). Este último máximo se corresponde con el máximo de absorbancia de los compuestos aromáticos. En función de estos resultados, se estimó la pureza de la parietina separada por HPLC en fase reversa utilizando una columna Nucleosil 5 C8. La detección se realizó por absorción a 280 nm. Los resultados revelaron que la parietina eluye con un tiempo de retención de 2,62 min con un índice de pureza del 97% (Fig. 8). La estabilidad de la parietina diluida en el tampón fosfato 75 mM, pH 6,9 (tampón en el que se llevaron a cabo las reacciones enzimáticas) es muy elevada como así lo muestra la no detección de productos de degradación por cromatografía en fase reversa tras tres días de dilución a temperatura ambiente y oscuridad.

La cuantificación de la parietina se realizó mediante interpolación de los valores de cuentas de área obtenidos en una recta de calibrado construida con concentraciones crecientes de parietina (índice de pureza de 97%). La recta fue ajustada por el método de mínimos cuadrados eligiendo el rango de linealidad del detector.

La actividad ureasa en pared se valoró en presencia o ausencia de esta antraquinona a concentración conocida. El mismo ensayo se realizó con ureasa cristalina comercial. La Fig. 9 muestra la actividad ureasa en función de la cantidad de parietina incluida en las mezclas de reacción. Como se

observa, la actividad de esta enzima disminuye en función de la concentración de parietina, hasta hacerse cero a concentraciones de fenol semejantes a las encontradas en las paredes del fotobionte. Los resultados obtenidos en relación con la ureasa comercial confirman el papel inhibidor de esta antraquinona en la actividad ureasa.

3.-LIGAMIENTO DE LA LECTINA INTRATALINA

Los ensayos de ligamiento entre la lectina con actividad arginasa y la ureasa de pared se realizaron a nivel microscópico, tanto óptico como electrónico, así como a nivel bioquímico, detectando por HPLC de exclusión molecular que tal unión se verificaba y comprobando mediante ensayos químicos los posible cambios en su actividad enzimática.

3.1. Ensayos enzimáticos de ligamiento en fotobiontes y en paredes celulares

Los estudios de unión lectina-receptor se realizaron en fotobiontes recién aislados y no tratados (usados como control) y en fotobiontes inducidos con urea 100 mM durante 2h. También se ensayo su desorción con galactosa 20 mM y 10 mM durante 30 min. (Apartado 6.1 , Material y Métodos). Tras incubar la lectina y el ficobionte, se separaron las células por centrifugación. La Tabla 1 recoge las actividades enzimáticas de la lectina en el sobrenadante y en paredes celulares así como la actividad ureasa de las paredes del fotobionte.

La actividad arginasa de la lectina no tratada es de 1,6 unidades presentando un ligero descenso cuando ésta es incubada con fotobiontes aislados no tratados. Sin embargo, los valores de actividad descienden en un 99,2% cuando la lectina se incubó con fotobiontes que habían sido inducidos con urea durante 2 h. La desorción con galactosa 20 mM permitió una recuperación del 3,45% de la actividad arginasa. No se detectó actividad ureasa en ninguna de las fracciones de lectina. La actividad ureasa en paredes también presentó alteraciones en función de los tratamientos. Las algas inducidas presentaban actividad ureasa (Fig 6) pero perdieron totalmente dicha actividad tras incubación con lectina. Cuando

Tabla 1. Actividades enzimáticas de la lectina parcialmente purificada del líquen *Xanthoria parietina* y del receptor localizado en paredes celulares del fotobionte aislado de *X. parietina*

Preparación	Act. ureasa total (nmol amonio·min ⁻¹)	Act. arginasa total (μmol amonio·min ⁻¹)
Lectina	n.d.	1,6 ± 0,3
Lectina + fotobiontes recién aislados	n.d.	1,1 ± 0,2
Lectina + fotobiontes cultivados en urea 2h	n.d.	0,013 ± 0,002
Lectina desorbida con galactosa 20mM	n.d.	0,007 ± 0,01
Paredes celulares de fotobiontes cultivados en urea 2h	3,9 ± 0,5	0,00025 ± 0,0004
Paredes celulares con lectina adsorbida	n.d.	n.d.
Paredes celulares con lectina desorbida con galactosa 10mM	1,6 ± 0,2	n.d.

n.d. No detectada

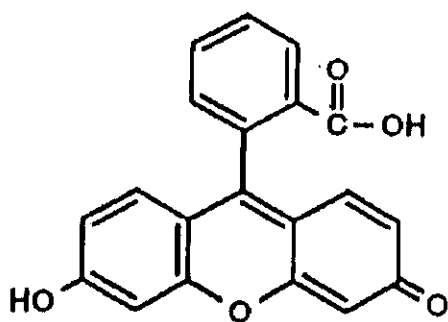
las paredes se sometieron a desorción en presencia de galactosa 10 mM, la actividad se recuperó en un 41%. Las paredes recién aisladas presentaban también cierta actividad arginasa ($2,5 \times 10^{-3}$ unidades), que se vio anulada tras la unión y que no fue recuperada tras la desorción.

3.2. Ensayos de ligamiento en fotobiontes con lectina marcada.

Ante los resultados enzimáticos obtenidos, el siguiente objetivo fue detectar la unión a nivel microscópico para lo cual se marcó la lectina directamente con dos tipos de marcadores diferentes.

- Fluoresceína

Se trata de un compuesto insoluble en agua con un peso molecular de 332.3 Da capaz de unirse a proteínas confiriéndoles la capacidad de ser detectadas al emitir fluorescencia amarillo-verdosa.



Fluoresceína

La unión de la lectina con el fluorógeno inhibía su actividad enzimática, que se reducía en un 67,3%, tal como se observa en la Tabla 2. Cuando arginasa comercial se marcó en las mismas condiciones que la lectina y se valoró su actividad, se verificó dicha inhibición, disminuyendo la actividad hasta un 54,2%. Estos resultados indican la capacidad de inhibición de la actividad arginasa de una molécula pequeña como la fluoresceína.

Tabla 2. Efecto del marcaje con fluoresceína y ferritina en la actividad arginasa detectada en la lectina y en arginasa comercial (Sigma Chem. Co.)

Preparación	Cantidad de proteína en mezcla de reacción (μg)	Actividad arginasa ($\mu\text{mol amonio} \cdot \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
Lectina	88	18,7
Lectina ^{Fl}	46	6,1
Lectina ^{Fr} (Fracción II)	34	17,1
Lectina ^{Fr} (Fracción III)	0,44	n.d.
Arginasa comercial	300	44,1
Arginasa comercial ^{Fl}	300	20,2
Arginasa comercial ^{Fr}	300	40,1

n.d. No detectada

^{Fl} Proteína marcada con fluoresceína^{Fr} Proteína marcada con ferritina

-Ferritina

Es una proteína de elevado peso molecular constituida por un 20-24% de hierro, lo que la hace localizable por microscopía electrónica de transmisión. Su capacidad de unirse a otras proteínas permite detectar la proteína marcada a nivel ultraestructural

Tras la unión de la lectina a esta proteína, como se indicó en el apartado 4.2 (Material y Métodos), el asociado fue filtrado por una columna de Sephadex G-150. Como se observa en la Fig. 10, la proteína eluye entre los volúmenes 90 y 120 ml observándose el máximo a 280 nm (detección de proteína) y a 460 (detección de ferritina) entre los volúmenes 100-110 ml (fracción II) y 110-120 ml (fracción III). Dichas fracciones fueron recogidas, valorando su actividad. Tal como se observa en la Tabla 2, la fracción II no presentó actividad arginasa detectable, posiblemente porque estaba formada por agregados ferritina-ferritina, mientras que para la fracción III se estimó una actividad similar a la de la lectina sin marcaje previo. Esto indica que la unión proteína-proteína a través de un intermediario como el glutaraldehído no afecta el centro activo de la lectina.

3.2.1. Unión de lectina fluorescente y fotobiontes aislados.

Las proteínas fueron marcadas tal como se indicó en el apartado 4 (Material y Metodos) y posteriormente incubadas con fotobiontes recién aislados o inducidos (Apartado 6.2 , Material y Métodos). Inmediatamente después de la incubación, se observaron las preparaciones en fresco de las células por microscopía de fluorescencia. Los resultados a nivel microscópico se recogen en la Fig. 11. Las Figs. 11.A y 11.B muestran un cultivo de fotobiontes no inducidos e incubados con lectina marcada con fluoresceína utilizando filtros específicos que recogían la emisión de fluorescencia (Fig. 11.A) y en luz blanca (Fig. 11.B). Como se observa en la Fig. 11.A, prácticamente no existía emisión de fluorescencia amarilla, lo que indicaba que no se había producido unión de la proteína a las paredes. La fluorescencia roja, consecuencia de la emisión de las clorofilas a 685 nm mostraba que las células eran fotosintéticamente activas. Cuando los fotobiontes fueron previamente incubados con urea y

presentaban ureasa en pared, la lectina fluorescente se unió a paredes del autobionte, como se observa en la Fig. 11.C. Esta unión suponía una pérdida de las actividades enzimáticas que no llegaba a recuperarse totalmente tras la desorción con galactosa (Tabla 2). Desde el punto de vista óptico, no se observaba plasmolisis ni variaciones en el tamaño y la forma de los fotobiontes que tenían la lectina unida a su pared (Fig. 11.D). Cuando los talos fueron inducidos con urea 100 mM y posteriormente se aislaron los fotobiontes, el número de células con fluorescencia amarilla fue menor. La Tabla 3 recoge el número de células contabilizadas en cinco campos tomados al azar, así como el número y porcentaje de células fluorescentes. La aplicación del estadístico X^2 de contingencia revelaba diferencias estadísticamente significativas entre los fotobiontes inducidos (33% fluorescencia) y los fotobiontes recientemente aislados e incubados con la proteína fluorescente (11,7% fluorescencia amarilla). No existen diferencias estadísticamente significativas en el número de células con fluorescencia amarilla entre fotobiontes aislados de talos inducidos o de talos no tratados. Sin embargo, la intensidad de la fluorescencia de los primeros es mayor en relación con los fotobiontes no tratados (Fig. 11.A y 11.E).

La lectina parcialmente purificada de *Xanthoria parietina* (Familia *Teloschistaceae*) fue marcada con el fluorocromo e incubada con fotobiontes aislados del líquen *Evernia prunastri* (Fam *Usneaceae*) previamente inducidos con urea 40 mM durante 4h (Vicente y Perez-Urria, 1989). Ambos líquenes pertenecen a familias muy alejadas filogenéticamente. A pesar de ello, ciertos fotobiontes del cultivo fueron capaces de unir en su pared la lectina marcada, e incluso esta proteína se unía a restos de hifas que aparecían en el aislamiento (Fig. 11.F).

Con objeto de verificar que el tratamiento de los fotobiontes con urea exógena durante un período de tiempo prolongado no provocaba daños significativos en relación con los no tratados, se cuantificó el número de células vivas y muertas en los tres tratamientos. El concepto de célula viva se definió como célula fotosintéticamente activa, es decir, capaz de emitir en la zona del rojo (685 nm) tras excitación con luz azul o ultravioleta. El número de células muertas se calculó como células totales

Tabla 3. Análisis cuantitativo de número de fotobiontes de *Xanthoria parietina* con lectina fluorescente unida a su pared (fluorescencia amarilla positiva). Análisis estadístico (χ^2 contingencia) comparando los distintos tratamientos.

	Tratamiento	Algas		
		Fluorescencia amarilla +		Total
		número	%	número
①	Fotobiontes recién aislados	31	11,9	260
②	Fotobiontes aislados de talo incubado en urea durante 2h	14	11,6	121
③	Fotobiontes aislados e incubados en urea 2h	43	30,9	139
		Tratamiento estadístico		
		χ^2 contingencia		Significación
		1/3	14,27	**
		1/2	0,003	—
		2/3	9,33	**

** $p < 0,01$

(detectadas en luz blanca)-células vivas (detectadas por emisión de fluorescencia) de acuerdo con Marx y Peveling, (1983). La Tabla 4 recoge estos datos así como el resultado de la aplicación del estadístico χ^2 de contingencia con un límite de significación de $p < 0.01$. Como se observa, los tratamientos de inducción no provocaron daños drásticos que condujeran a la muerte de las células algales.

La población de fotobiontes no tratados fue estudiada por análisis de imagen con objeto de obtener datos sobre la distribución de frecuencias del tamaño de los fotobiontes. Los resultados se muestran en la Fig. 12. Las células en estudio constituyen una población natural de *Trebouxoides* recientemente aislada, heterogénea, con una variabilidad fenotípica que se reflejaba en la distribución de frecuencias de área o tamaño celular. La distribución se alejaba de una distribución Normal como consecuencia de la alta frecuencia (aproximadamente 0,5) obtenida para fotobiontes con un área menor de 100 μm^2 .

3.2.2. Unión de lectina marcada con ferritina a fotobiontes aislados

La lectina fue también marcada con ferritina, tal como se indica en el apartado 6.2. (Material y Métodos), e incubada con células del alga incubadas en presencia del inductor o solamente en tampón. Tras el proceso, las células se prepararon para microscopía electrónica de transmisión (Apartado 6.2.2., Material y Métodos). Las electrografías que aparecen en la Fig. 13.B. permitieron la localización del receptor de la lectina marcada con ferritina en la pared celular del fotobionte. Los gránulos densos a los electrones, dispuestos alrededor de la pared, correspondían al acúmulo de iones hierro asociados a la lectina como consecuencia del marcaje. La precipitación de estos iones metálicos sobre la pared pueden producir daños ultraestructurales en la misma que favorezcan la formación de "fantasmas" (Fig. 13.B). Cuando los fotobiontes no presentaban actividad ureasa en su pared (Tabla 2) y eran incapaces de unir lectina fluorescente (Fig. 11.C.) tampoco se revelaron gránulos densos a los electrones consecuencia de la unión del complejo lectina-ferritina al receptor de pared (Fig. 13.A).

Tabla 4. Análisis cuantitativo de la viabilidad celular en los distintos tratamientos. Número de células y porcentaje de algas vivas así como el total de células observadas en cinco campos ópticos tomados al azar. Análisis estadístico (χ^2 contingencia) comparando los distintos tratamientos.

Tratamiento	Algas		
	Células vivas		Total
	número	%	número
① Fotobiontes recién aislados	89	78,1	114
② Fotobiontes aislados de talo incubado en urea durante 2h	110	76,9	143
③ Fotobiontes aislados e incubados en urea 2h	78	76,5	102
	Tratamiento estadístico		
	χ^2 contingencia		Significación
	1/3	0,079	-
	1/2	0,046	-
	2/3	0,016	-

$p < 0,01$

3.2.3. Ligamiento de fotobiontes con lectina no marcada. Citoaglutinación y pérdida de las condiciones fotoenergéticas.

Fotobiontes recién aislados fueron incubados en arginina 28 mM durante 30 min con objeto de conocer si el fotobionte era capaz de captar este aminoácido del medio de cultivo. La valoración de la concentración de arginina, tanto en el medio de incubación como en el espacio intracelular, se realizó tal como se describe en el apartado 7.2. (Material y Métodos). La Fig. 14 muestra los resultados obtenidos. Un fuerte descenso de la concentración de este aminoácido en el medio se observó después de 30 min de incubación. La concentración descendió desde valores de $28 \text{ mmol} \times \text{ml}^{-1}$ hasta $1,28 \text{ mmol} \times \text{ml}^{-1}$. En paralelo se observó un incremento de la concentración del aminoácido en el medio intracelular de los endosimbiontes. La concentración de arginina en los Trebouxoides antes del tratamiento se estimó en $0,086 \text{ mmol} \times \text{mg}^{-1}$. Después de la incubación en arginina 28 mM, la cantidad de dicho aminoácido incrementó 2,63 veces. Estos resultados permiten, por tanto, verificar la entrada de arginina desde el medio extracelular al interior del fotobionte en las condiciones experimentales descritas.

Los fotobiontes cebados con el aminoácido fueron sometidos a distintos tratamientos. Una alícuota de suspensión se incubó en urea 100 mM durante 2h y posteriormente se transfirió a medio BBM-líquido que contenía la lectina. Otra alícuota fue transferida directamente al medio de incubación con la proteína y por último, se preparó un control tratado con arginina únicamente. Se observó crecimiento en los diferentes medios de cultivo de la población del autosimbionte, consecuencia de la incubación en un medio nutritivo (Fig. 15.A). Este crecimiento se detectó como aumento del peso seco de los cultivos, alcanzándose un máximo a 2h para descender hasta tomar valores próximos a los iniciales. En paralelo, se valoró la concentración de clorofilas en todos los cultivos en función del tiempo. El cociente entre la concentración de clorofilas y el peso seco mostró que las algas previamente

cebadas con arginina durante 30 min y que más tarde fueron incubadas en urea durante 2h para inducir ureasa en pared mantenían el contenido relativo de clorofilas sin cambios significativos durante 3h de cultivo en BBM-líquido con la lectina parcialmente pura. Sin embargo, el cultivo utilizado como control claramente disminuía el contenido clorofílico en función del peso seco, si bien las células no llegaban a blanquearse totalmente. Sin embargo, una drástica pérdida de clorofilas, que llegó a ser prácticamente total a las 3 h, fue observada en cultivos donde el proceso de inducción del receptor había sido evitado (Fig. 15.B). Es decir, en base a los resultados obtenidos, parece evidente una clara relación entre la actividad biológica de la lectina y la pérdida de las condiciones fotoenergéticas (Fig. 15).

Cuando los fotobiontes no contenían ureasa glicosilada en pared, no se observaron nódulos de aglutinación después de 3h de incubación con la lectina (Fig. 16.B), ni aún después de 5 h (Fig. 16.C). En estos casos, las células presentaron una disposición similar a las células control, tiempo cero (Fig. 16.A). Sin embargo, cuando los fotobiontes contenían ureasa glicosilada en pared, mostraron aglutinación a las 3 h (Fig. 16.E) en relación con el control, tiempo cero (Fig. 16. D), que se hizo más patente a las 5 h de incubación (Fig. 16.F). La estabilidad de los nódulos hacía pensar que las lectinas no contenían otra actividad enzimática de carácter hidrolítico. Tras la unión de ambas proteínas, lectina y receptor, se observó un descenso significativo en las actividades enzimáticas (Tabla 2).

Por último, la lectina descrita hasta el momento fue capaz de formar nódulos de aglutinación estables con eritrocitos humanos del grupo B (Fig. 17). Los primeros nódulos se observaron a los 5 min de tratamiento en preparaciones selladas (Fig. 17.B) por comparación con el control (Fig. 17.A). La aglutinación fue prácticamente total a los 15 min de observación (Fig. 17.C). Cuando los eritrocitos fueron incubados en suero salino, no se observó aglutinación después de 30 min.

Los resultados revelan que la unión de la lectina a la pared celular ocurre de forma específica a nivel del receptor pero no a nivel celular, dado que la lectina es capaz de unirse a células del fotobionte de *Xanthoria parietina* y de *Evernia prunastri* e incluso a eritrocitos humanos.

3.2.4. Detección citoquímica de ureasa en pared e inhibición por unión con lectina

La detección citoquímica a nivel ultraestructural de ureasa en paredes celulares confirmó la localización bioquímica a nivel enzimático (Fig. 6), así como la total inactivación de la ureasa tras la unión entre la lectina y la enzima de pared (Tabla 1).

La Fig. 18 muestra las ultramicrografías donde se observan los resultados obtenidos. Gránulos densos a los electrones procedentes del depósito de sulfuro de cobalto se observaron masivamente sobre la pared celular de fotobiontes inducidos con urea (Fig. 18.A y 18.B, detalle). El depósito de esta sal cristalizada puede producir puntos de rotura en la pared (Fig. 18.A). Aquellas células control no sometidas a tratamiento de inducción se revelaron ureasa-negativas al observarlas por MET (Fig. 18.C). Cuando un potente inhibidor de ureasa como la tolbutamida se incorporó al medio de reacción, no se detectó ureasa en paredes previamente inducidas con urea y por tanto, con actividad ureasa (Fig. 18.D). Por último, cuando la lectina se unió a paredes celulares no se detectó actividad ureasa a nivel ultraestructural (Fig. 18. E).

La detección de ureasa se cuantificó en una población de fotobiontes recién aislada, así como en fotobiontes incubados durante 2h en urea 100 mM en tampón fosfato 75 mM, pH 6,9 y en fotobiontes recién aislados de talos inducidos en las mismas condiciones. Las células fueron observadas por microscopía óptica de contraste de fase, cuantificándose el número de células ureasa-positivas en cada tratamiento (Tabla 5).

Los resultados se presentan como número y porcentaje de células ureasa-positivas frente al total de células observadas en cinco campos tomados al azar. El tratamiento estadístico de los datos reveló diferencias significativas entre los fotobiontes inducidos con urea (27,13% de células ureasa-positivas) y los otros tratamientos control donde el porcentaje de células detectables se aproximó al 14,0%.

Tabla 5. Análisis cuantitativo de número de fotobiontes de *Xanthoria parietina* que contienen actividad ureasa en pared (ureasa positiva). Análisis estadístico (χ^2 contingencia) comparando los distintos tratamientos

Tratamiento	Algas		
	Ureasa +		Total
	número	%	número
① Fotobiontes recién aislados	24	14,28	168
② Fotobiontes aislados de talo incubado en urea durante 2h	27	13,77	196
③ Fotobiontes aislados e incubados en urea 2h	35	27,13	129
	Tratamiento estadístico		
	χ^2 contingencia		Significación
	1/3	7,25	**
	1/2	0,019	-
	2/3	15,25	**

** : $p < 0,01$

Conviene resaltar la aproximación en el porcentaje de células ureasa positivas de los distintos tratamientos (Tabla 5) y el porcentaje de células capaces de unir lectina fluorescente (Tabla 3). Estos resultados parecen de nuevo verificar que sólo aquellas células que presentan ureasa glicosilada en pared son capaces de unir la lectina intratinalina.

3.2.5. Determinación de la unión lectina-paredes con actividad ureasa

Una muestra de 1,0 ml de lectina fue analizada por HPLC de exclusión molecular (Fig. 19) , tal como se describe en el apartado 8 (Material y Métodos)

La lectina no tratada y aquella incubada con fotobiontes inducidos durante 2h fueron dializadas y liofilizadas para su posterior análisis por HPLC. La lectina eluida por el sistema cromatográfico indicado y detectada a 280 nm se reveló como una mezcla multiproteica con al menos seis polipéptidos diferentes. Los dos picos mayoritarios presentaban tiempos de retención de 25,91 min y 27,65 min (Fig. 19.A). Cuando la fracción proteica fue incubada con paredes celulares con actividad ureasa y el sobrenadante, recuperado por centrifugación, fue cromatografiado, sólo aparecieron cinco picos. En este caso los picos mayoritarios tenían tiempos de retención de 18,31 y 24,42 (Fig. 19.B). El cromatograma diferencia entre aquel procedente de la elución de la lectina y el sobrenadante tras la incubación se muestra en la Fig. 19.C. Sólo apareció un pico mayoritario en este cromatograma, con un tiempo de retención de 26,02 min, el cual representaba la proteína que con mayor eficacia se unía a paredes celulares. El pico con un tiempo de retención de 14,53 min (Fig. 19.B) fue enmascarado por el pico 15,74 min mientras que la proteína que eluyó con un tiempo de retención de 18,31 min fue anulada por la suma de los picos a 17,93 min y 18,37 min (Fig. 19.C). El pico de 24,42 min en la Fig. 19.B. apareció en el cromatograma diferencia como un pequeño hombro ancho con un máximo a 24,92 min, siendo enmascarado parcialmente por el pico de 25,91 min. El pico que en el cromatograma diferencia aparecía con un tiempo de retención de 26,02 min correspondería por tanto a la proteína que aparecía en la muestra no adsorbida de lectina con un tiempo de retención de 25,91 min y que no se detectó en el

sobrenadante. Este pico correspondía a una proteína que eluía en el filtrado por Sephadex G-150 (Fig. 4.) entre las fracciones 60-80 ml. Por otra parte, la proteína que eluía en esta fracción tenía una gran actividad arginasa y se comportaba como una proteína glicosilada (Fig. 4.).

Cuando la lectina marcada con fluoresceína fue eluida por el sistema cromatográfico descrito (Apartado 8.2., Material y Métodos), se revelaron cinco proteínas con tiempos de retención entre 25,62 y 35,33 cuando la mezcla se analizó por absorbancia a 280 nm (Fig. 20.A). De ellas, los cuatro mayoritarias estaban marcadas con fluoresceína tal como indicó el cromatograma obtenido de la detección por emisión de fluorescencia (Fig. 20.B). En este último, los tiempos de retención estaban ligeramente atrasados, dado que la detección se realizó en serie pasando la muestra separada en columna de exclusión molecular primeramente por el detector de absorbancia y después por el de fluorescencia.

Las fracciones II y III, separadas por Sephadex G-150 tras el marcaje con ferritina, se resolvieron en dos separaciones diferentes. La Fig. 21. A muestra el cromatograma obtenido de la fracción II que no presentó actividad arginasa (Tabla 2). Se detectó un único pico con tiempo de retención 21,1 min, que probablemente correspondía al complejo formado por ferritina-ferritina. Sin embargo, el cromatograma obtenido de la fracción III mostró dos picos, uno de ellos con un tiempo de retención de 21,1 min (ferritina-ferritina) y un pico mayoritario que eluía a 22,1 min y que probablemente correspondía al asociado ferritina-lectina. Un pequeño hombro a 25,19 min podría representar los agregados de lectina-lectina. Esta fracción presentó una elevada actividad arginasa (Tabla 2).

Por tanto, los estudios de ligamiento entre la lectina parcialmente purificada y paredes celulares parecen confirmar que el receptor específico de la lectina parcialmente purificada extraída de talos de *Xanthoria parietina* se localiza en la pared celular del fotobionte bajo determinadas condiciones de inducción y se trata de una proteína con actividad ureasa.

4.-MODIFICACIONES ULTRAESTRUCTURALES

4.1. Análisis del mantenimiento de la simbiosis

Los datos preliminares que mostraban pérdida de las condiciones fotoergónicas en aquellos fotobiontes preincubados en arginina y transferidos a BBM-líquido con la lecitina disuelta, fueron confirmados por MET. De igual manera, se verificó la atoxicidad del proceso de inducción de ureasa en pared en presencia de una elevada concentración de urea y el efecto de la captación de arginina (Fig. 14) a nivel estructural.

En este caso, se trabajó con talos líquénicos con intención de observar los efectos de los diferentes tratamientos y controles en el equilibrio entre los biontes que constituyen la simbiosis.

La ultraestructura de talos recién recolectados y no tratados se muestra en las Fig. 22 y 23. El fotobionte y micobionte aparecieron íntimamente unidos a través de una matriz extracelular, sin llegar a detectarse en ningún caso haustorios intracelulares (Fig. 22). La Fig. 23.A muestra un detalle del ficobionte de *Xanthoria parietina*. Su descripción estructural es propia de los endosimbiontes del género *Trebouxia* y *Pseudotrebouxia*. Presenta un cloroplasto abundante y un pirenoide central con pirenoglóbulos bien definidos del tipo *impressa* (Friedl, 1989). Los tilacoides se asociaban formando agrupaciones membranosas en el cloroplasto. El complejo vesicular, formado por grandes vacuolas, se localizó alrededor del plasmalema y cerca de cuerpos de reserva, probablemente de naturaleza lipídica (Fig. 22, detalle en Fig. 23.B). El micobionte presentaba estructuras membranosas complejas (Fig. 22, detalle en Fig. 23.B.).

La incubación de talos líquénicos con 28 mM de arginina durante 30 min producía fuertes alteraciones ultraestructurales (Fig. 24). Ambos biontes aparecieron colapsados y el área de contacto entre ellos claramente modificada (Fig. 24.A). Se detectó la aparición de pirenoglóbulos satélites. Tanto

en éstos como en el central, la definición de los pironoglóbulos fue menor respecto al control no tratado. Las membranas tilacoidales aparecían desorganizadas (Fig. 24.B).

Las muestras incubadas en urea 100 mM durante 2h no sufrieron modificaciones ultraestructurales importantes, ni en la zona de contacto, donde se observaban ocasionalmente haustorios intraparietales pero nunca intracelulares (Fig. 25, detalle en Fig. 26.A), ni en la forma de los biontes (Fig. 25). Particular interés tuvo la distribución elipsoidal que en ciertas ocasiones se observó en los pirenoglóbulos del pirenoide (Fig. 26.B).

El equilibrio simbiótico se mantuvo y las hifas no mostraron cambios respecto al control (Fig. 22) cuando los talos fueron cebados con arginina 28 mM, incubándose con urea 100 mM durante 2h y posteriormente transferidos a la disolución con la lectina en la que se mantuvieron durante 18h (Fig. 27). La zona de contacto micobionte-ficobionte no se vió modificada (Fig. 27.A) y el pirenoide fue localizado centralmente dentro del cloroplasto, pero los pirenoglóbulos se orientaron en forma elipsoidal o a modo de media luna, al igual que los tilacoides (Fig. 27.B y C).

Sin embargo, la interrelación entre ambos biontes se rompió cuando los talos fueron preincubados con arginina y posteriormente transferidos a un medio de incubación con la lectina en disolución, donde se mantuvieron durante 18 h (Fig. 28). En este caso, la ultraestructura de las algas estaba completamente desorganizada, observándose roturas de pared con la consiguiente pérdida del contenido citoplasmático (Fig. 28.C y 29). Nuevas estructuras de naturaleza vacuolar aparecieron en el sistema (Fig. 28.A y C), así como prolongaciones haustoriales intracelulares. La Fig. 28.C y 28.B (detalle) muestra los haustorios cortados transversalmente, mientras que la Fig. 29 presenta uno de ellos en corte longitudinal. Se observó una clara infección por diferentes tipos de bacterias en este tratamiento (Fig. 28.A.). El estudio bacteriológico del líquen no tratado mostró que la simbiosis en condiciones normales presenta xenobiontes bacterianos del tipo pseudomonadales. La naturaleza epífita o simbionte de las bacterias no está definida.

Estos resultados están básicamente de acuerdo con los obtenidos mediante análisis preliminar de la concentración de clorofilas tras los diferentes tratamientos (Fig. 15.B). La concentración de clorofilas se hacía prácticamente cero en los fotobiontes cargados con arginina e incubados con la lectina frente a los fotobiontes que habían sido tratados previamente con urea, induciendo ureasa de pared. En este caso, no existía pérdida de las condiciones fotoergónicas, manteniéndose la concentración de clorofilas durante el tiempo de análisis sin cambios significativos.

4.2. Análisis de los fotobiontes incubados en urea 100 mM durante 4h.

Dado que el máximo de detección de ureasa en paredes del endosimbionte se obtuvo incubando los fotobiontes en urea 100 mM durante 4 horas a 26°C, se comprobó si este tratamiento químico podría tener consecuencias ultraestructurales en los fotobiontes.

Las posibles modificaciones en la cara externa se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido. Con objeto de favorecer el subsiguiente proceso de fijación y deshidratación de los fotobiontes, necesario para su observación ultramicroscópica, los fotobiontes fueron fijados en un soporte de naturaleza biológica, tal como se describe en el apartado 10.2.2. (Material y Métodos). La Fig. 30 muestra las electrografías obtenidas tras las observaciones. La Fig. 30.A. presenta los fotobiontes inducidos en urea durante 4h adheridos a las fibras de bioskin por un proceso de adsorción iónica entre los restos de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina que forman la matriz del soporte y polímeros aniónicos de la pared del fotobionte a valores de pH neutros. No se observaron modificaciones estructurales en la pared celular cuando las muestras fueron comparadas con fotobiontes aislados y no tratados, tal como se observa en la Fig. 30.B. No se pudieron realizar observaciones con mayor detalle puesto que al amplificar la densidad flujo electrónico se dañaban las paredes (Fig. 30 C.). Sin embargo, en algunos casos, se pudo apreciar restos de la matriz gelatinosa que mantiene unidas a las algas en

simbiosis y que se mantuvo después de los tratamientos. No se observaron, sin embargo, impresiones debidas a la cristalización de ácidos de naturaleza fenólica.

El estudio de los fotobiontes por microscopía electrónica de transmisión igualmente verificó que el tratamiento de inducción previo no dañaba la ultraestructura del liquen. En todos los tratamientos, tanto del fotobionte inducido (Fig. 31), como en aquellos no incubados (Fig. 32) se observó cierta plasmolisis consecuencia, probablemente, del tratamiento drástico en el proceso de aislamiento de los ficobiontes (Fig. 31.B, Fig. 32.A y 32.B). Sin embargo, algunas células no mostraron este fenómeno, manteniéndose intacta la disposición de los tilacoides y los pirenoglóbulos (Fig. 31.A). Conviene resaltar la disposición elipsoidal de las membranas tilacoidales en algunas células cultivadas en urea (Fig. 31.B) frente al control (Fig. 32.A), tal como se había observado en las ultramicrografías de los talos liquénicos comparando los talos inducidos (Fig. 25) con el control (Fig. 22).`

Fig. 4. Diagrama de filtración de una lectina parcialmente purificada del líquen *X. parietina* a través de una columna de Sephadex G-150. Estimación de proteínas por absorbancia a 280 nm (o).
Actividad arginasa (■).

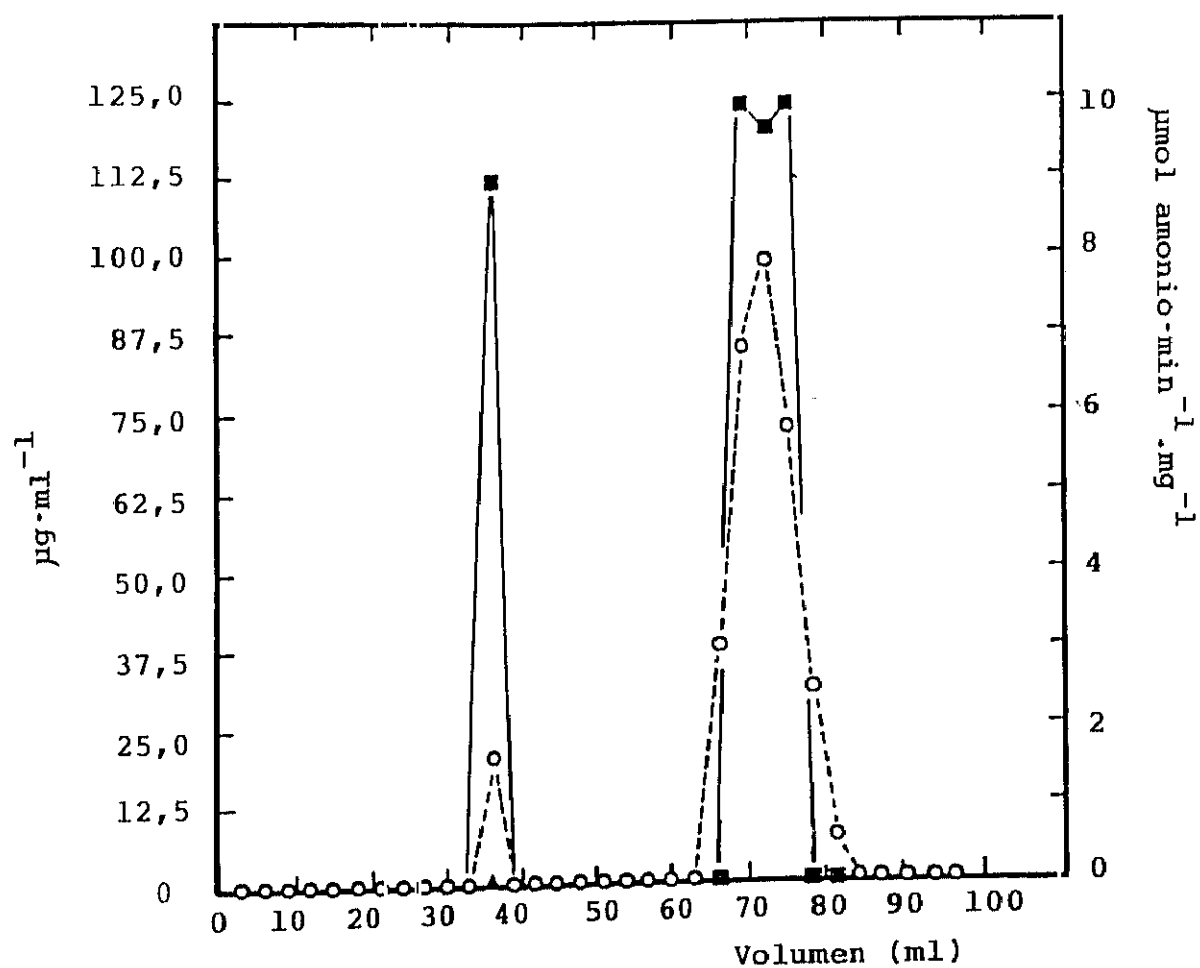


Fig. 5. Diagrama de filtración de una lectina parcialmente purificada del liquen *X. parietina* a través de una columna de Sephadex G-150. (A) Valoración de azúcares. (B) Recta patrón de glucosa.

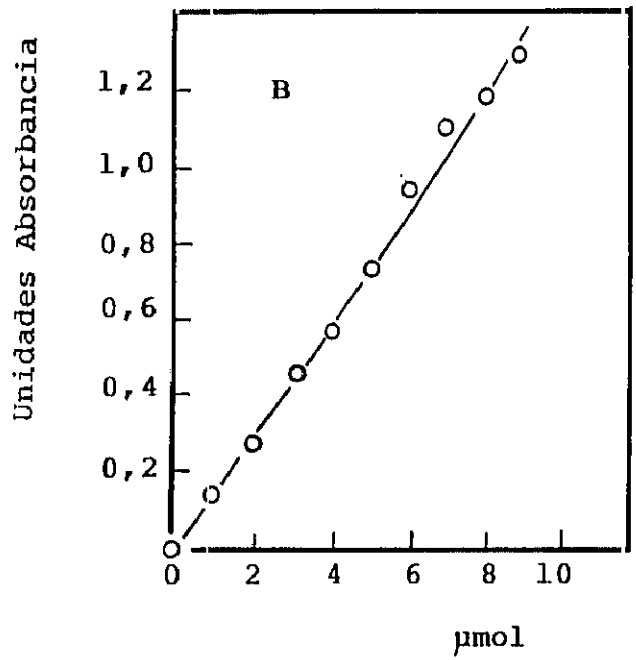
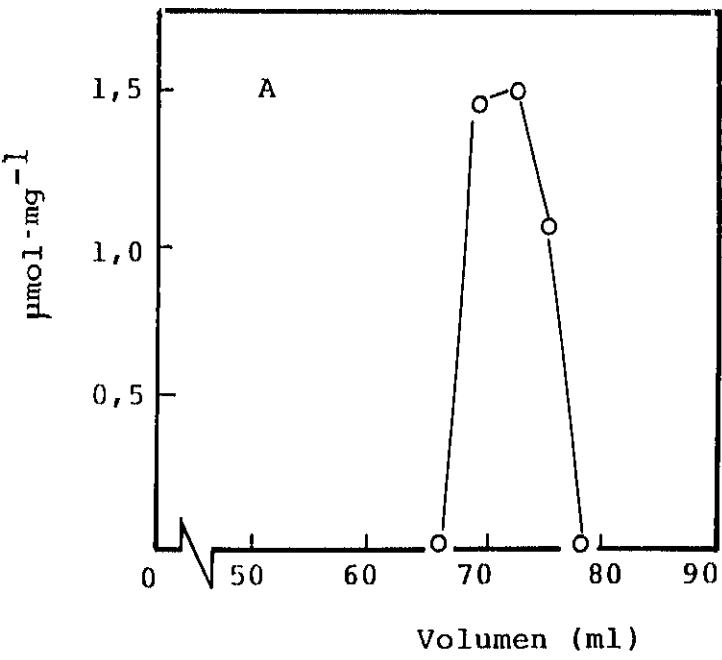


Fig. 6. Velocidad de reacción de ureasa en pared (**A**). Actividad específica de ureasa en pared (**B**).
Ambas valoraciones se realizaron tras incubar los fotobiontes a distintas concentraciones de urea: (○) 0 mM, (+) 20 mM, (◇) 40 mM, (□) 80 mM, (▽) 100 mM.

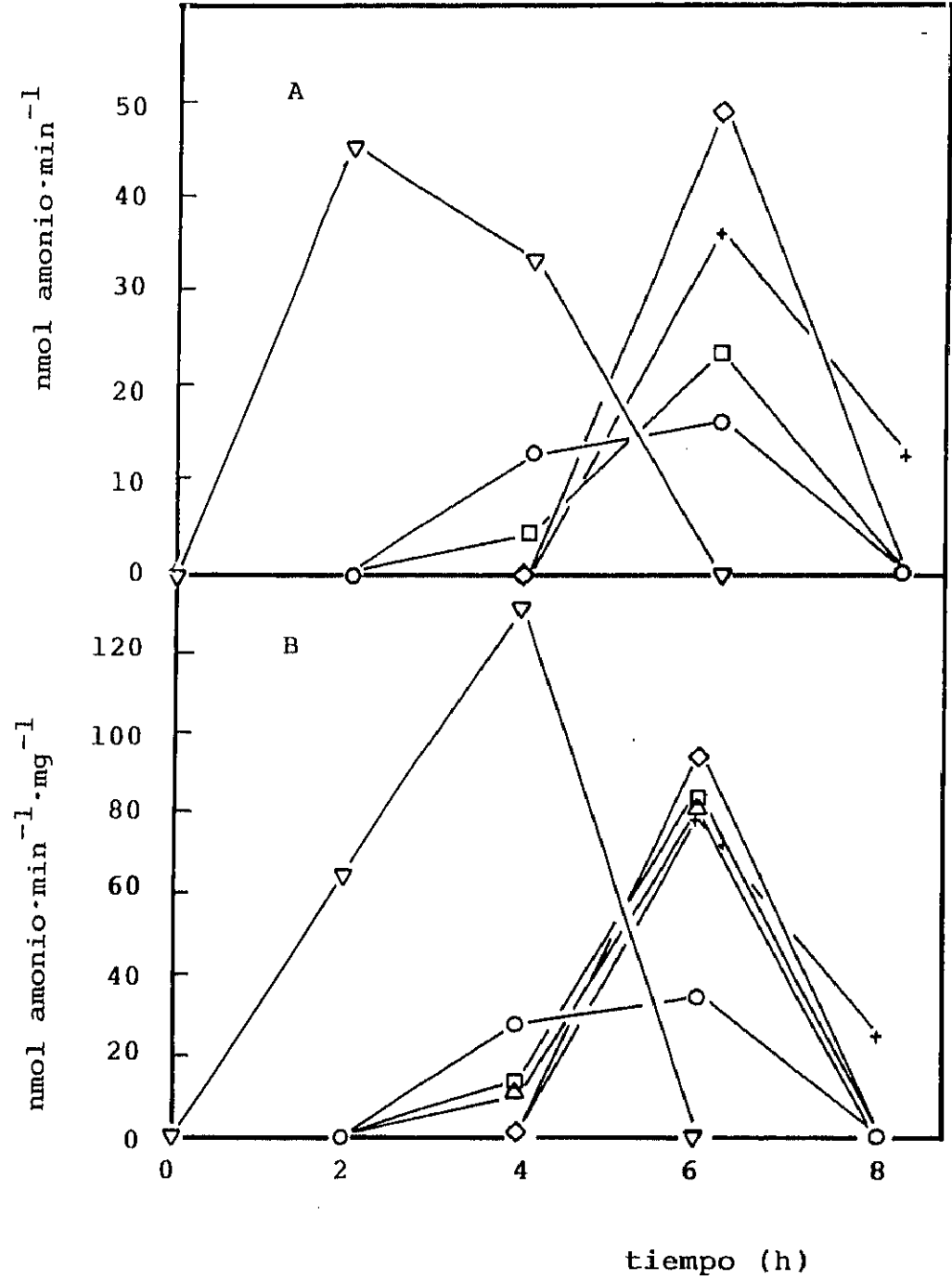


Fig. 7. Espectro de absorbancia de parietina extraída y purificada del liquen *X. parietina* entre 200 y 700 nm.

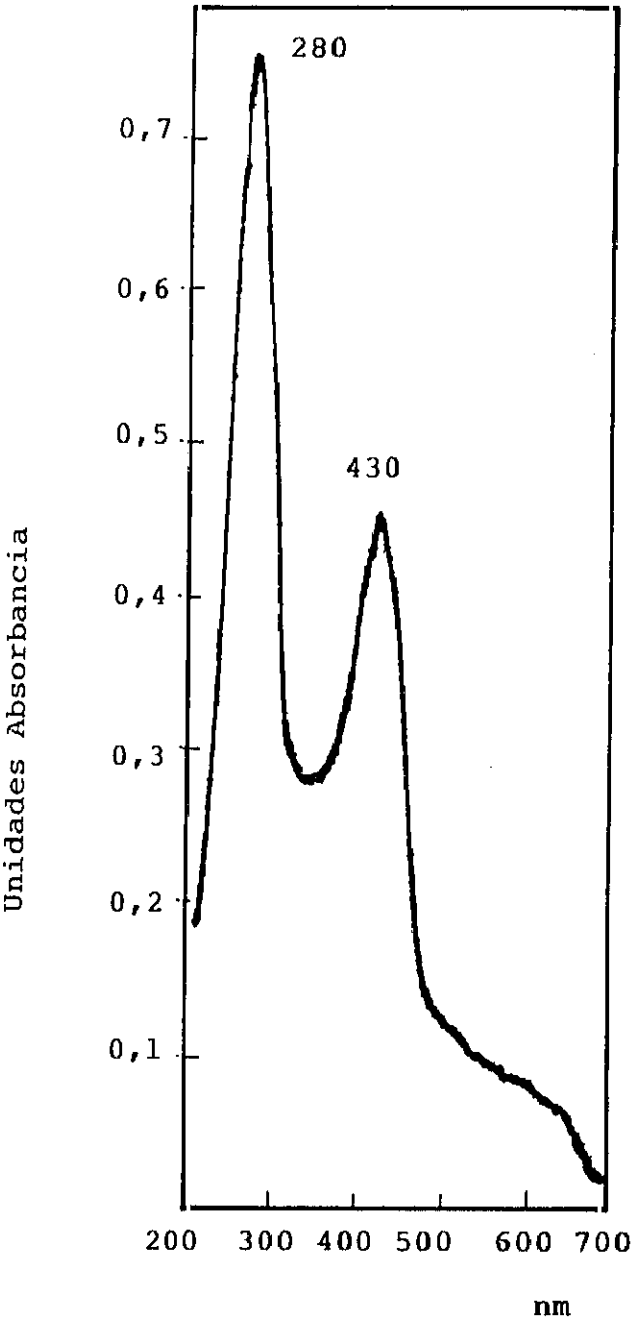


Fig. 8. Valoración de la purificación de la antraquinona por HPLC en fase reversa (índice de pureza 97%), según Pedrosa y Legaz (1991 a).

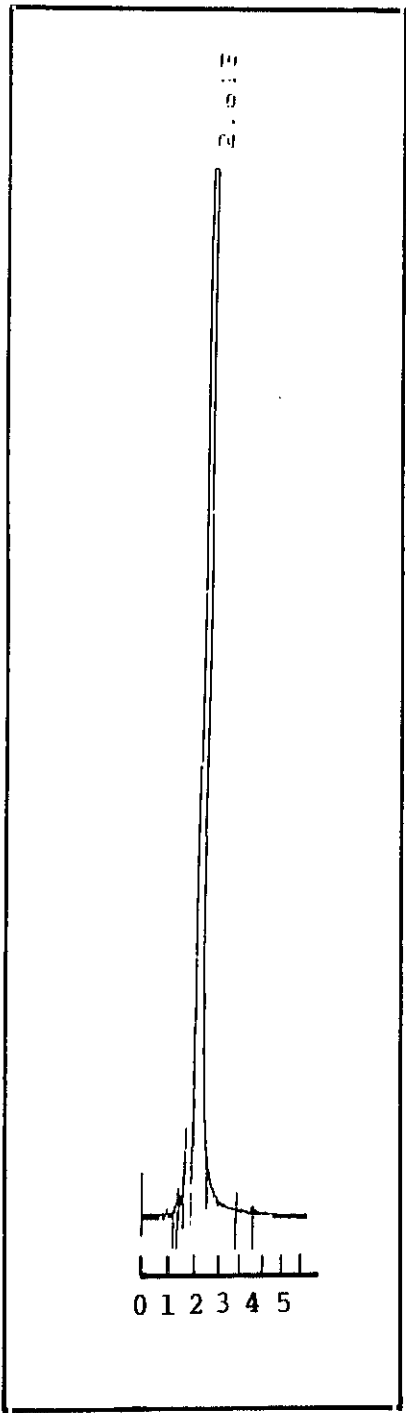


Fig. 9. Efecto de parietina a distintas concentraciones en la actividad ureasa de paredes de los trebouxoides de *X. parietina* (-) y en ureasa comercial de sigma Chem. Co. (-).

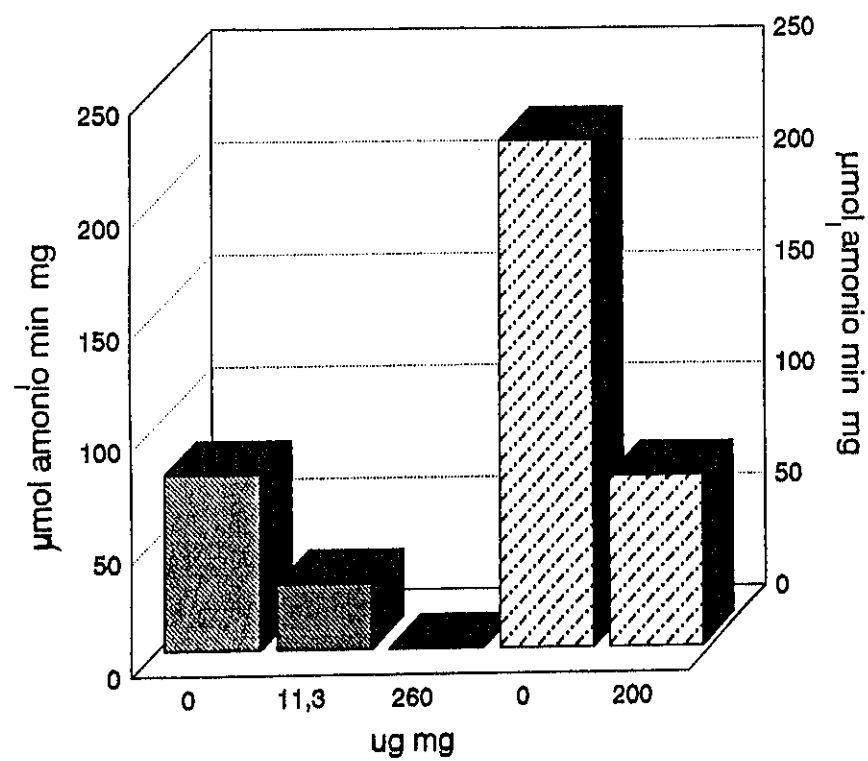


Fig. 10. Diagrama de filtración de la lectina parcialmente purificada y marcada con ferritina (Sigma Chem. Co.) a través de una columna de Sephadex G-150. Azul Dextrano 2000 (●) valorado por absorbancia a 600 nm. Absorbancia de las proteínas a 280 nm (■) o a 430 nm (▲).

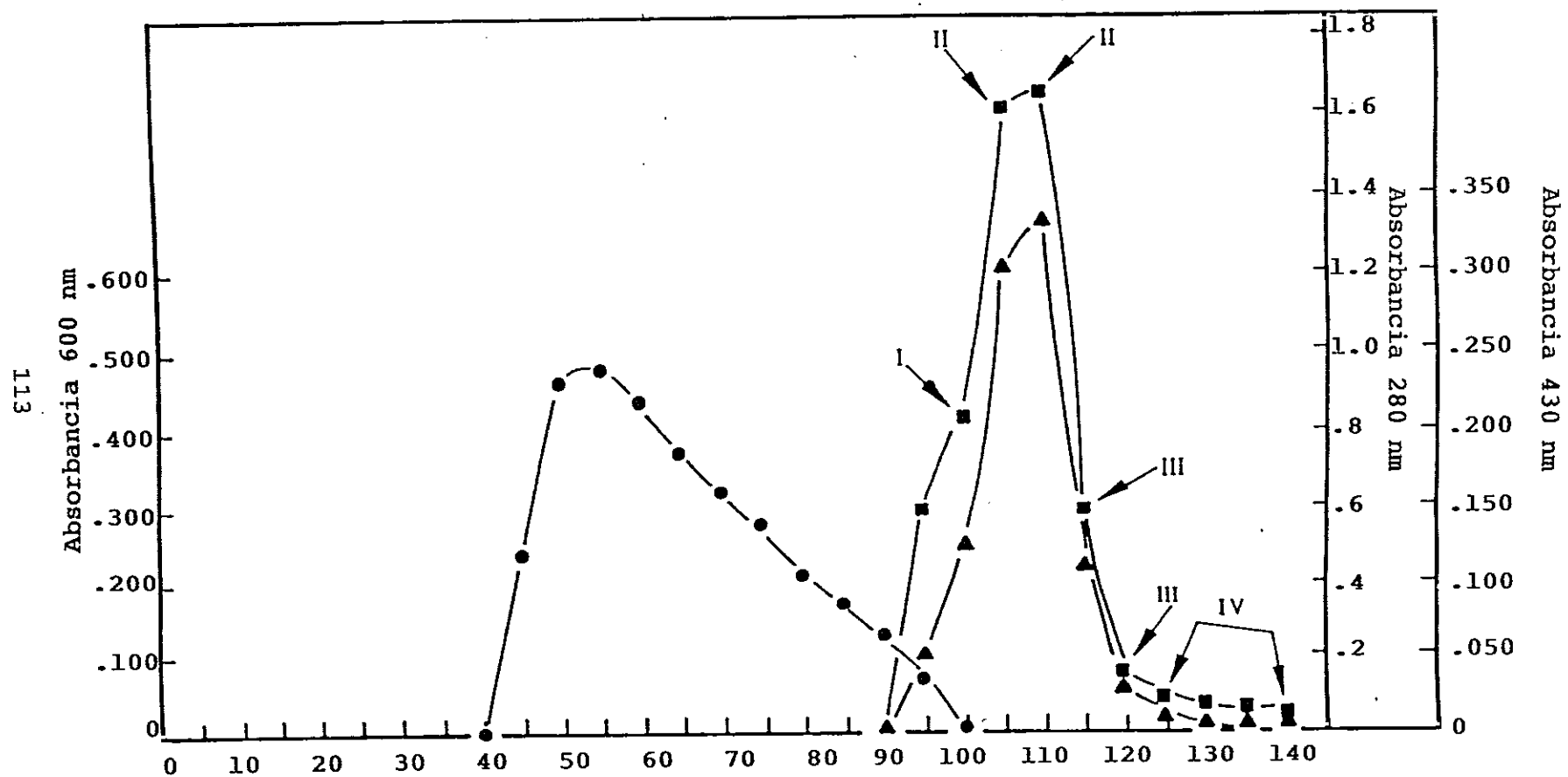


Fig. 11. Detección por microscopía de fluorescencia de lectina intratalina marcada con fluoresceína.

Micrografías obtenidas de fotobiontes aislados de talo no tratado del líquen *X. parietina* observadas por fluorescencia (A) y luz blanca (B); fotobiontes de talo no tratado de *X. parietina* e incubados durante 2h en urea observados por fluorescencia (C) y luz blanca (D); algas aisladas de talos de *X. parietina* incubados en urea durante 2h; algas aisladas de talos de *E. prunastri* incubados durante 4h en urea (F). La barra indica 50 μm en todas las micrografías. La flecha señala los fotobiontes con fluorescencia amarilla.

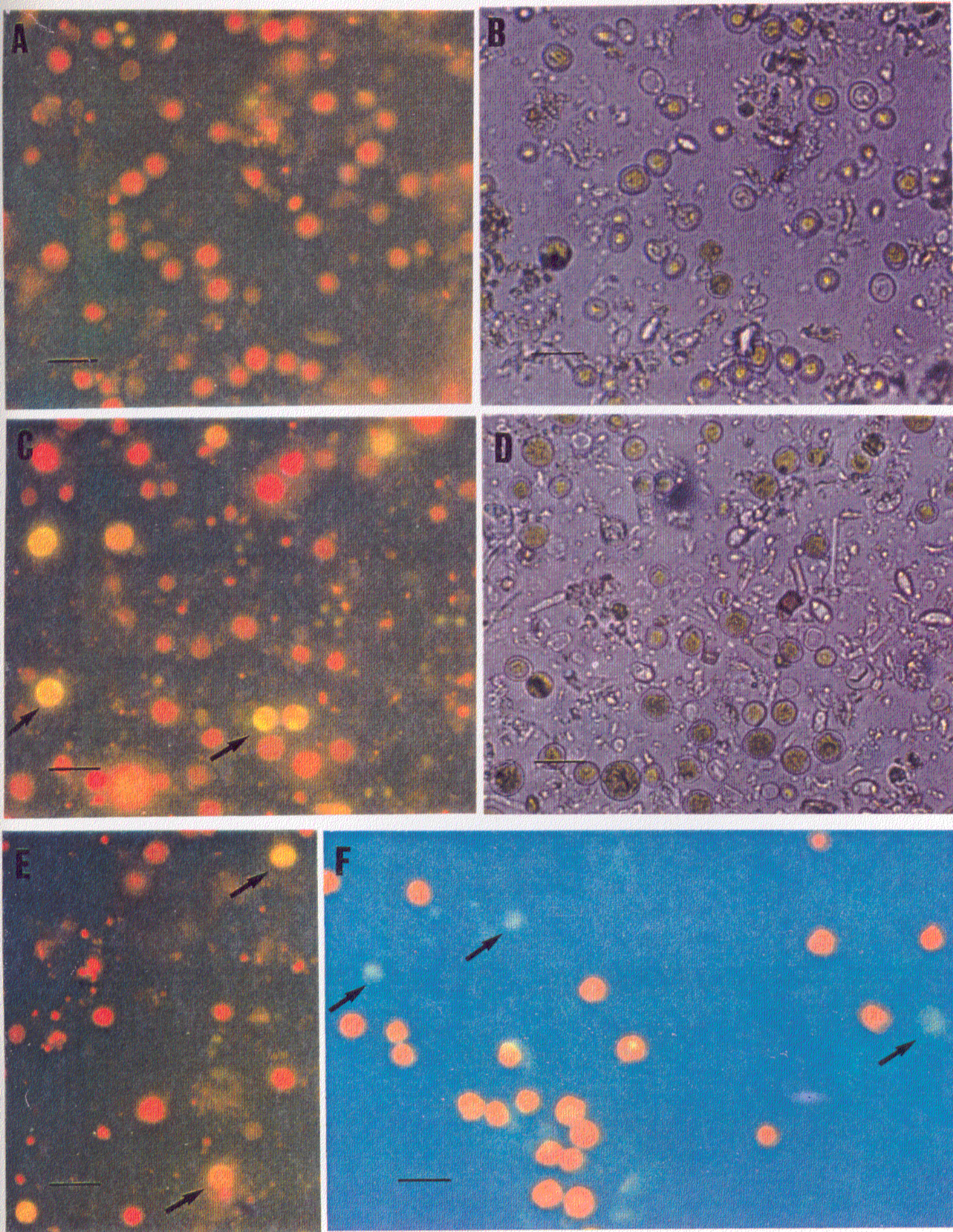


Fig. 12. Distribución de frecuencias de tamaños celulares del endosimbionte recién aislado de talos *X. parietina*.

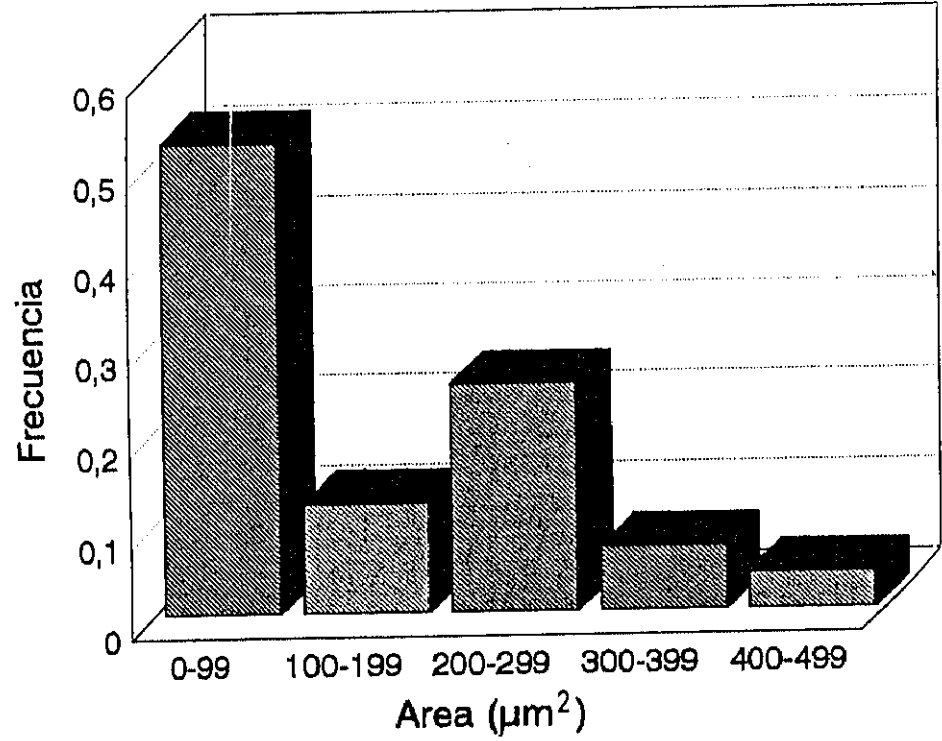


Fig. 13. Microscopía electrónica de transmisión. Localización ultraestructural de lectina marcada con ferritina. Fotobiontes recién aislados sin tratamiento (**A**) y aislados e incubados en urea durante 2h (**B**). Ambos fueron tratados posteriormente con lectina marcada. La barra indica 0,2 μm . CW, pared celular; CH, cloroplasto.

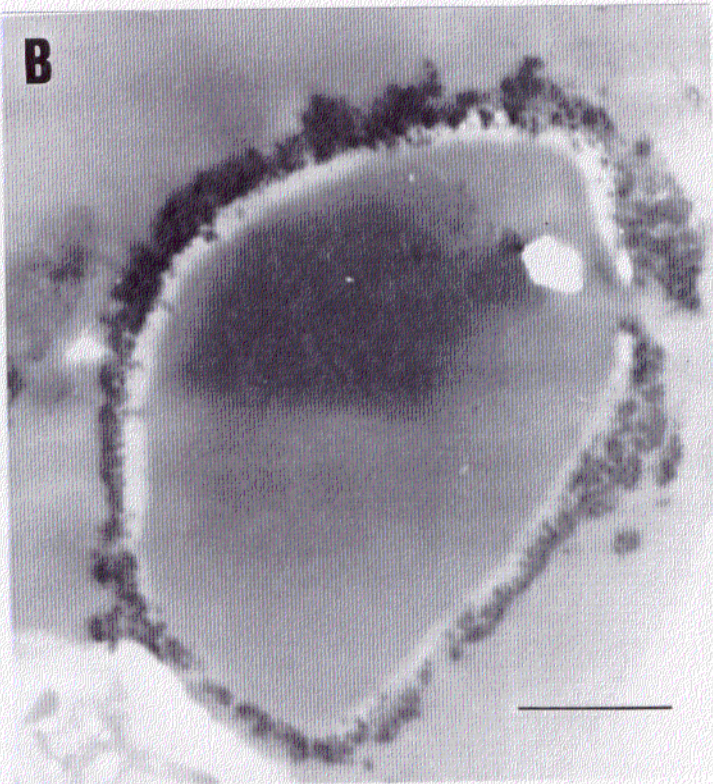


Fig. 14. Incorporación de arginina en los fotobiontes recién aislados de *X. parietina* tras incubación durante 30 min en arginina 28 mM. (—) Tiempo cero (-----) Tiempo 30 min..

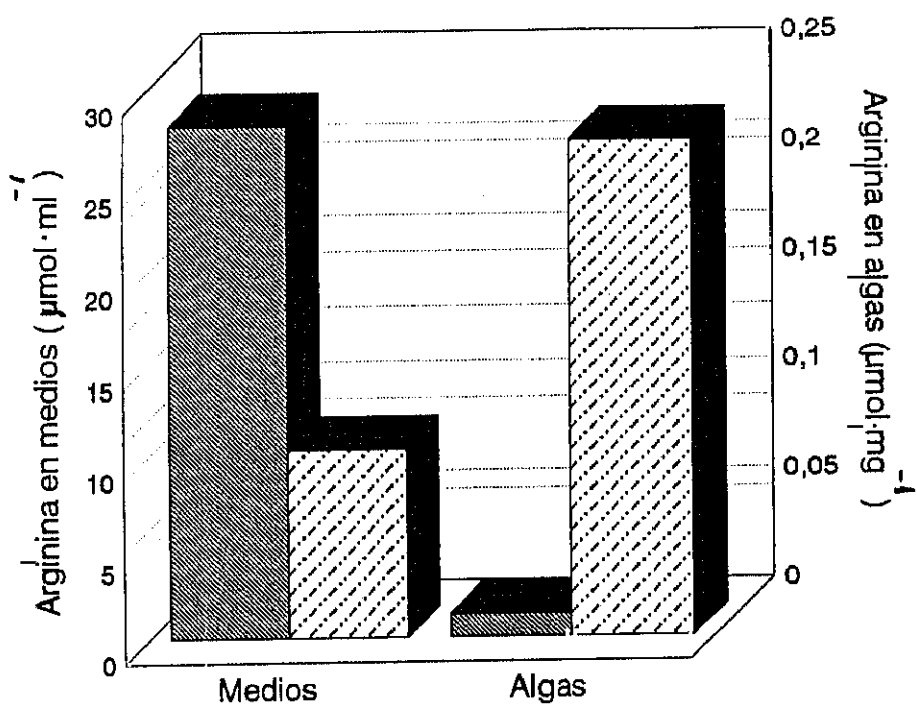


Fig. 15. (A) Crecimiento de fotobiontes de *X. parietina* en BBM. Fotobiontes cebados con arginina 30 min como control (●), fotobiontes preincubados con arginina y transferidos a medio de cultivo con lectina intratalina durante 3h (○), algas cebadas con arginina, inducidas en presencia de urea durante 2h y posteriormente incubadas con lectina (Δ). **(B)** Relación entre clorofilas totales y peso seco de los mismos cultivos de algas.

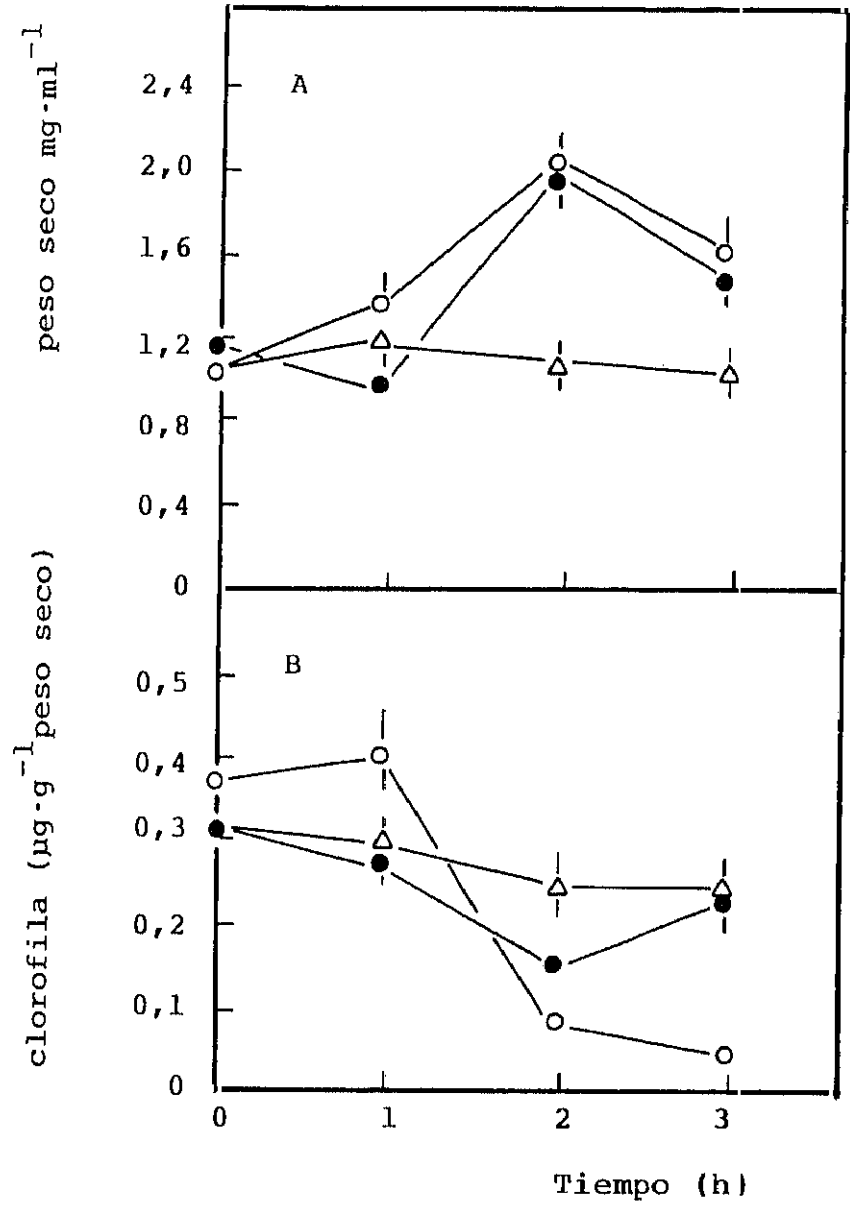


Fig. 16. Actividad fitoaglutinante de lectina intratalina de *X. parietina* frente a fotobiontes del mismo liquen. Micrografía óptica de fotobiontes cargados con arginina, sin el receptor ureasa en pared mantenidos en BBM en el momento de incorporar la lectina (A), 3h más tarde (B) y 5h después (C). Ensayo paralelo con fotobiontes cebados con arginina pero con actividad ureasa en pared, es decir, con el receptor inducido (D) a tiempo cero, (E) 3h y (F) 5h después.

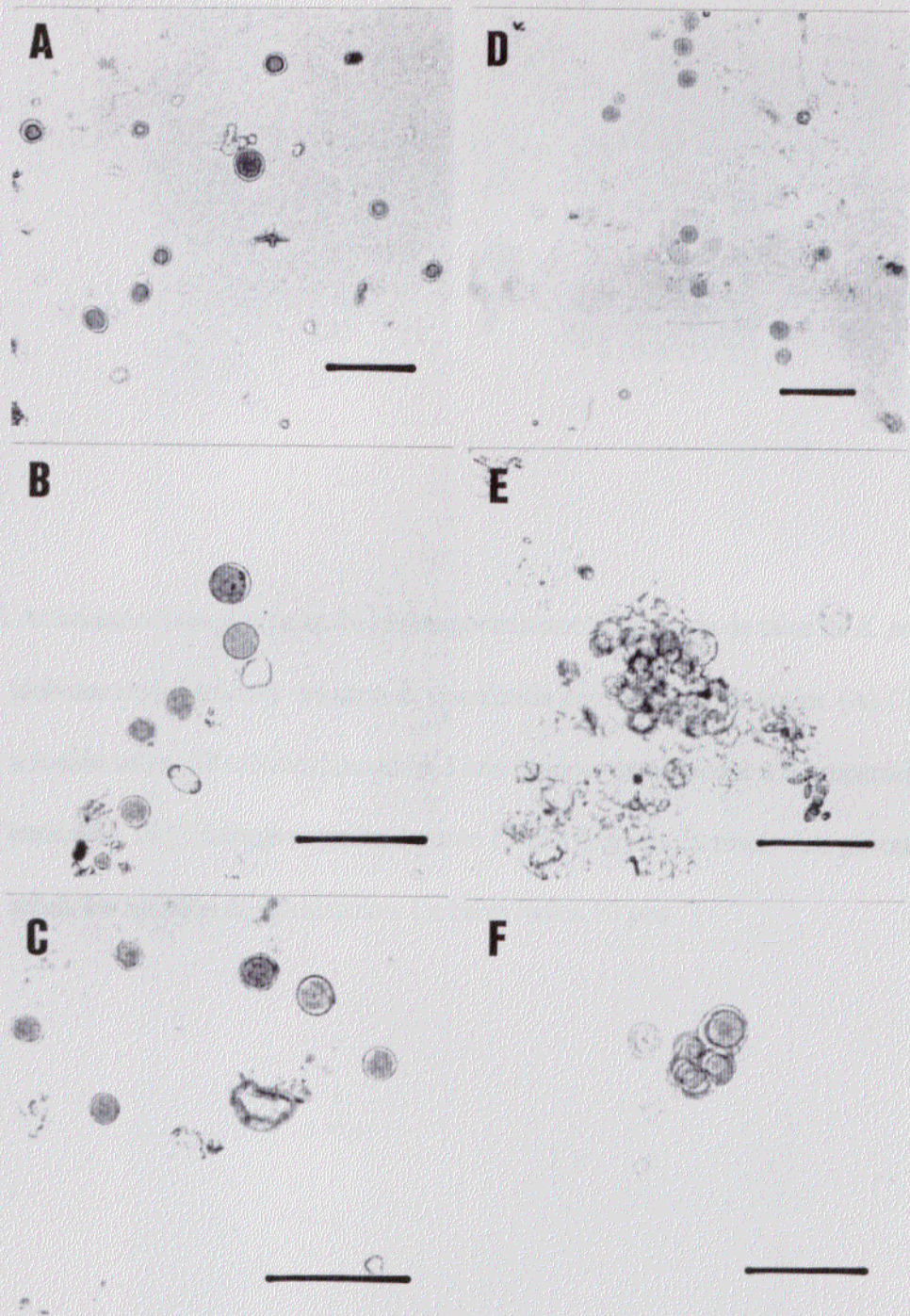


Fig. 17. Actividad eritroaglutinante de lectina parcialmente purificada de talos de *X. parietina* frente a glóbulos rojos humanos el grupo B⁺ visualizada por microscopía óptica. **(A)** Control en solución salina. **(B)** Hemaglutinación 5 min después de adicionar a la preparación lectina intratalina. **(C)**, Hemaglutinación durante 15 min después de añadir esta glicoproteína. La flecha señala los nódulos de aglutinación. La barra indica 10 μm .

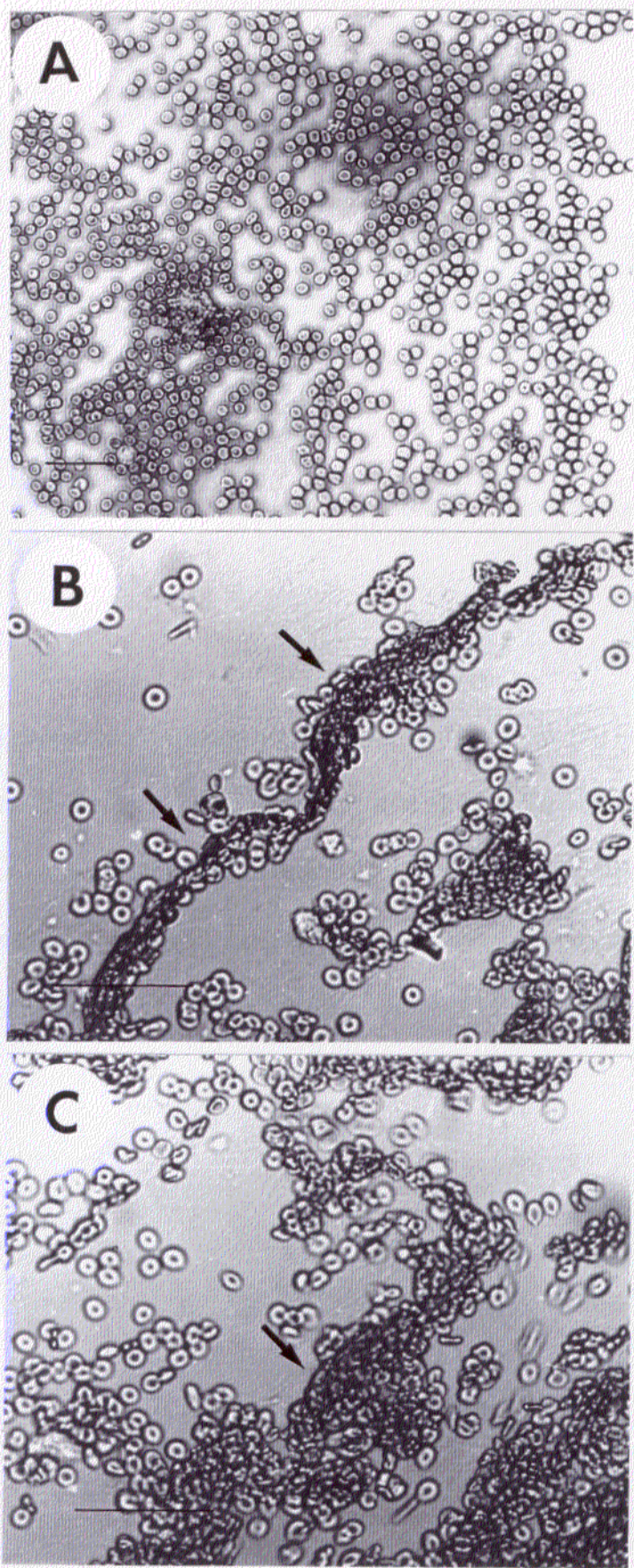


Fig. 18. Detección citoquímica de ureasa por microscopía electrónica. **(A)** Fotobiontes incubados en urea durante 2h. La flecha indica rotura de pared. **(B)** Detalle de la célula anterior. **(C)** Preparación control de fotobiontes recién aislados y no tratados. **(D)** Fotobiontes con actividad ureasa en pared en presencia de 10 mM de tolbutamida o **(E)** después de unir lectina a estas paredes. La barra indica 0,2 μm . CW: Pared celular, CH: cloroplasto.

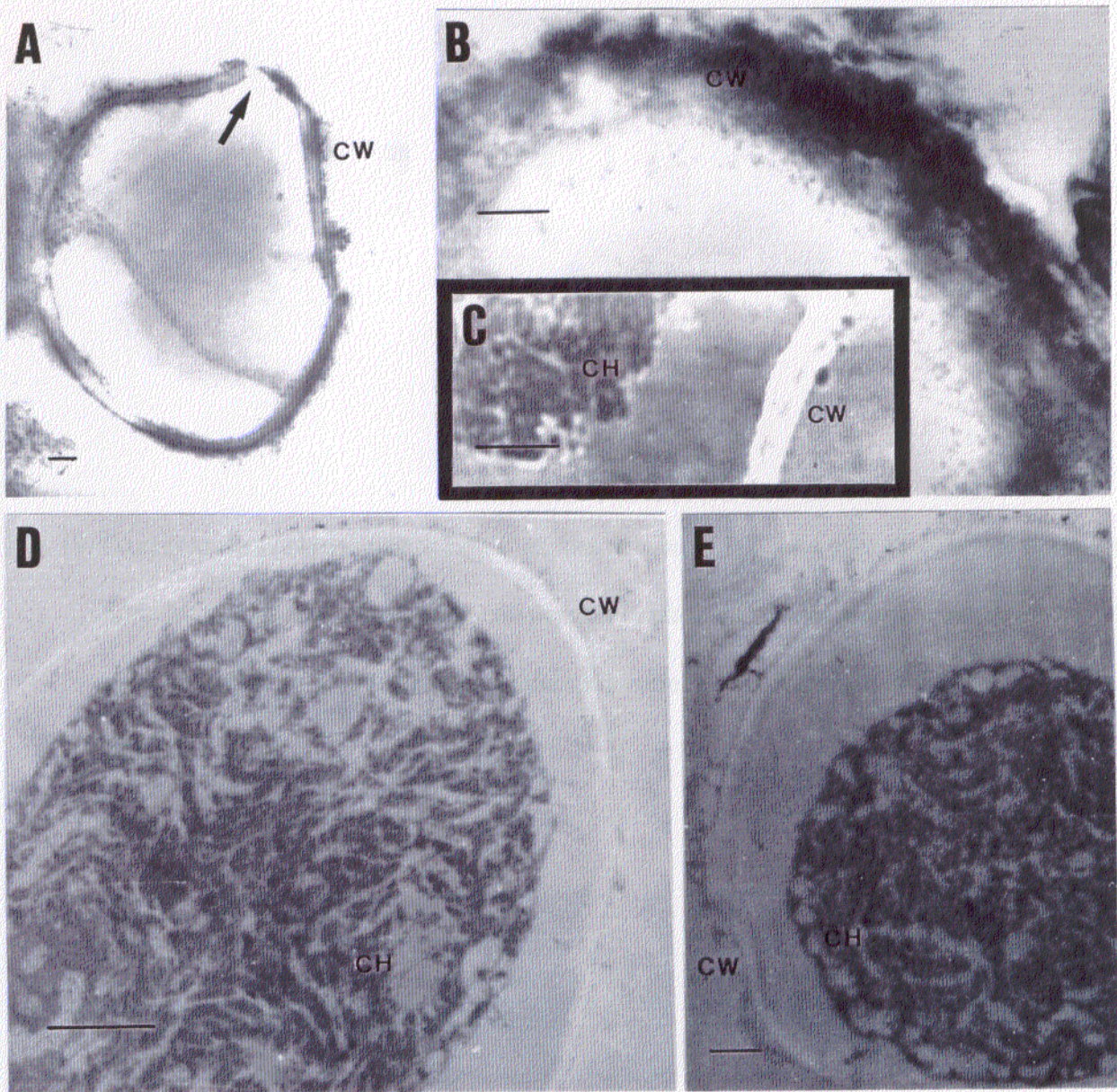


Fig. 19. Cromatogramas obtenidos por HPLC en fase reversa de la lectina parcialmente purificada antes (A) y después (B) de la incubación con paredes celulares del fotobionte que presentaban actividad ureasa. (C), Cromatograma diferencia entre A y B. Cada pico muestra su tiempo de retención.

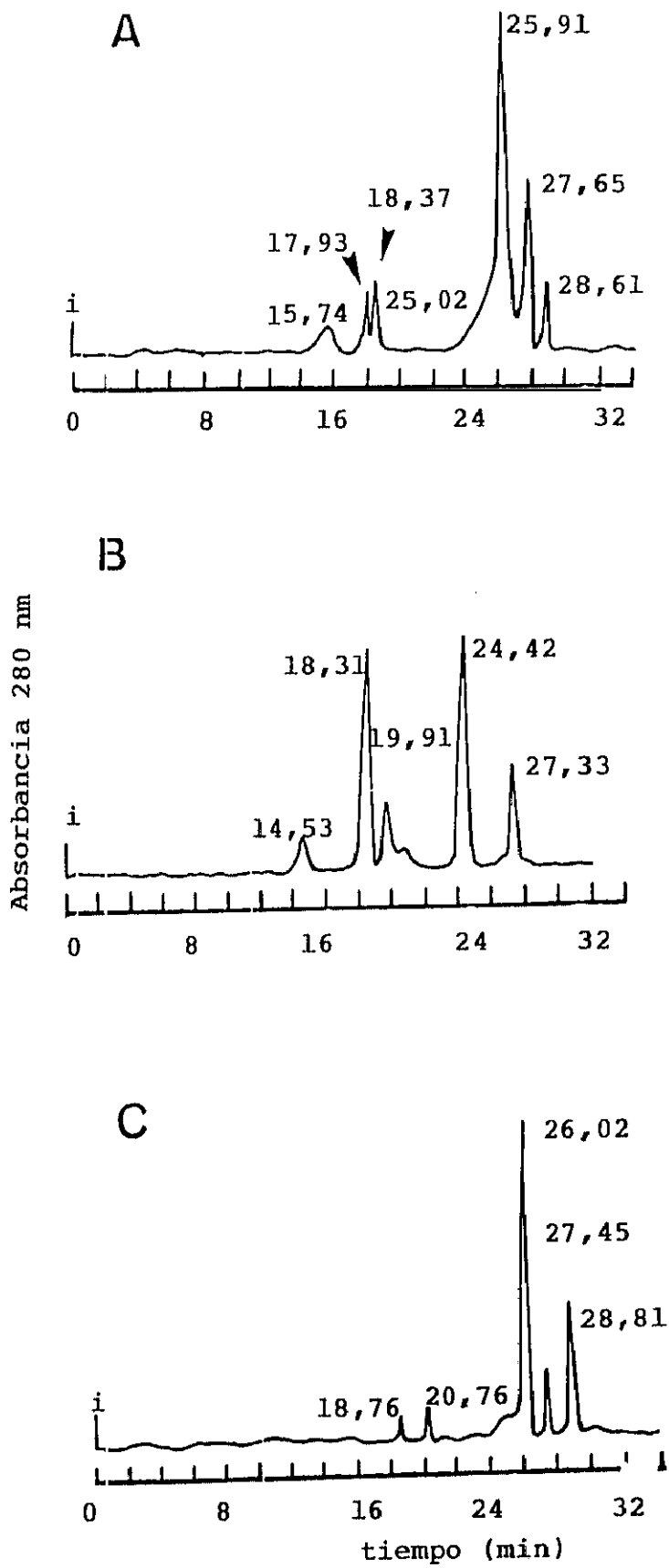


Fig. 20. Cromatogramas obtenidos por HPLC en fase reversa de lectina parcialmente purificada marcada con fluoresceína. Detección por absorbancia a 280 nm (A) y por emisión de fluorescencia (B). Cada pico muestra su tiempo de retención en min.

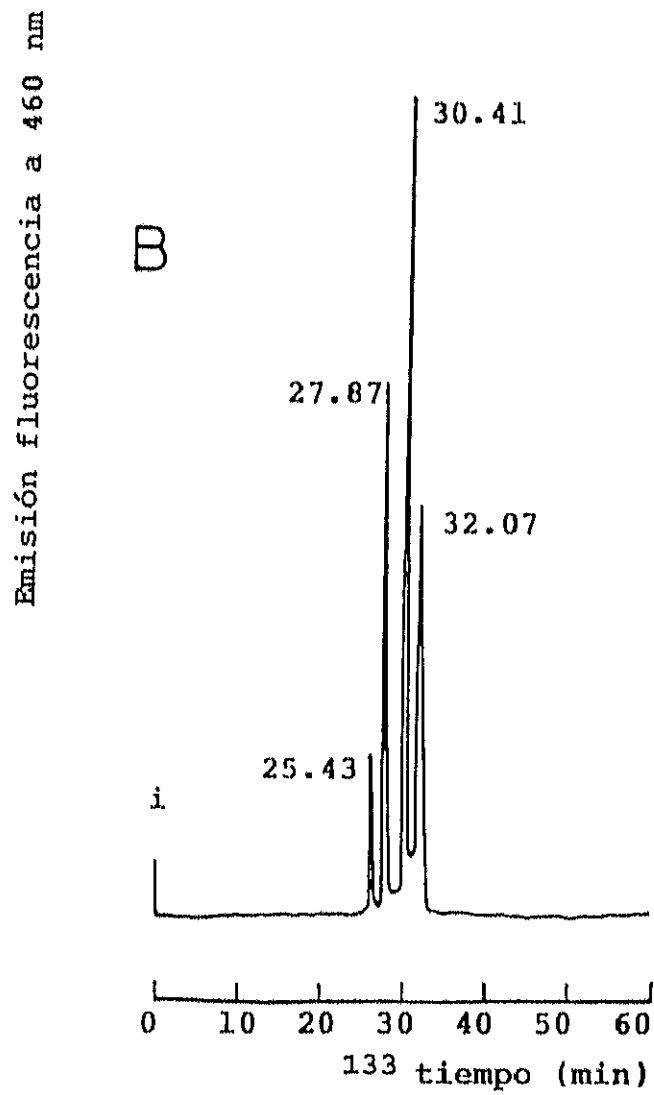
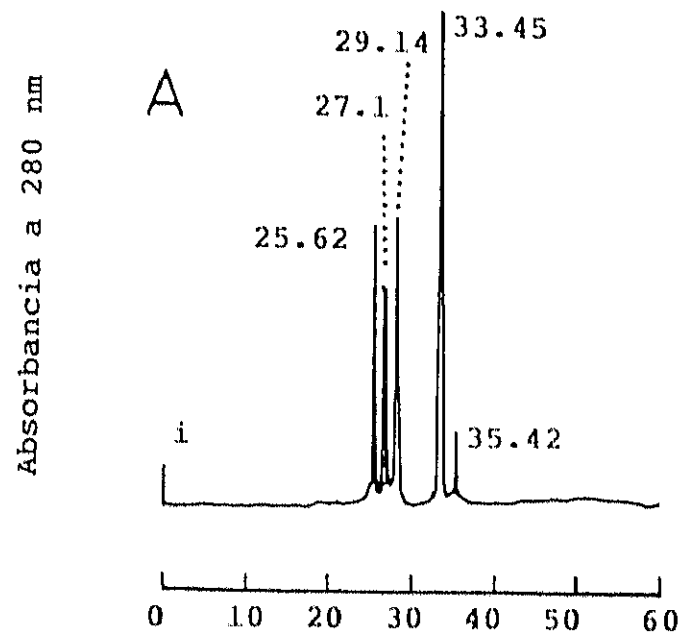


Fig. 21. Cromatogramas obtenidos por HPLC de fase reversa de las fracciones I (A), II (B) y III (C) recogidas tras filtración por Sephadex G-150 de lectina parcialmente purificada y marcada con ferritina (Fig. 10).

Absorbancia a 280 nm

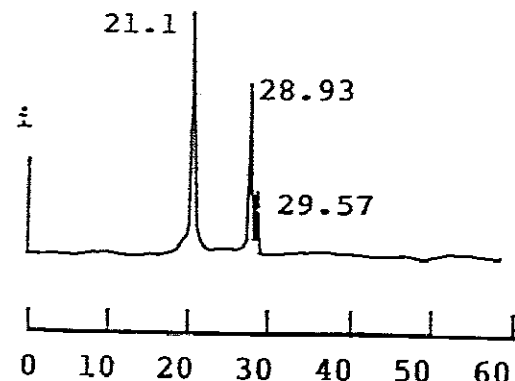
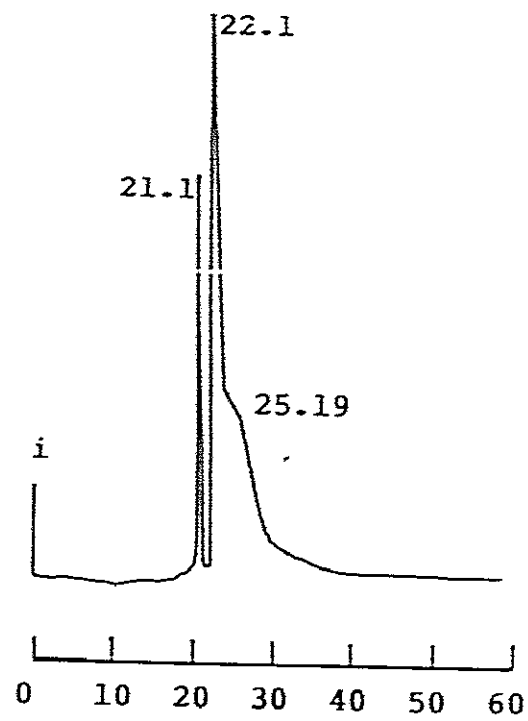
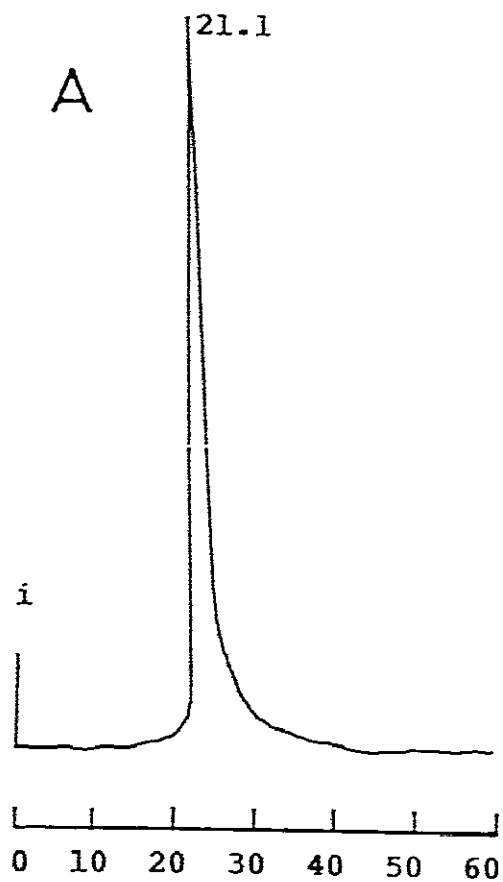


Fig. 22. Microscopia electrónica de transmisión de talos de *X. parietina* recién recolectados sin tratamiento. Visión general de la distribución e interacción entre fotobionte y micobionte en este liquen. La barra indica 1,0 μm . A, alga; CW, pared celular; H, hifa; SB, cuerpo de almacenamiento; V, vacuola.

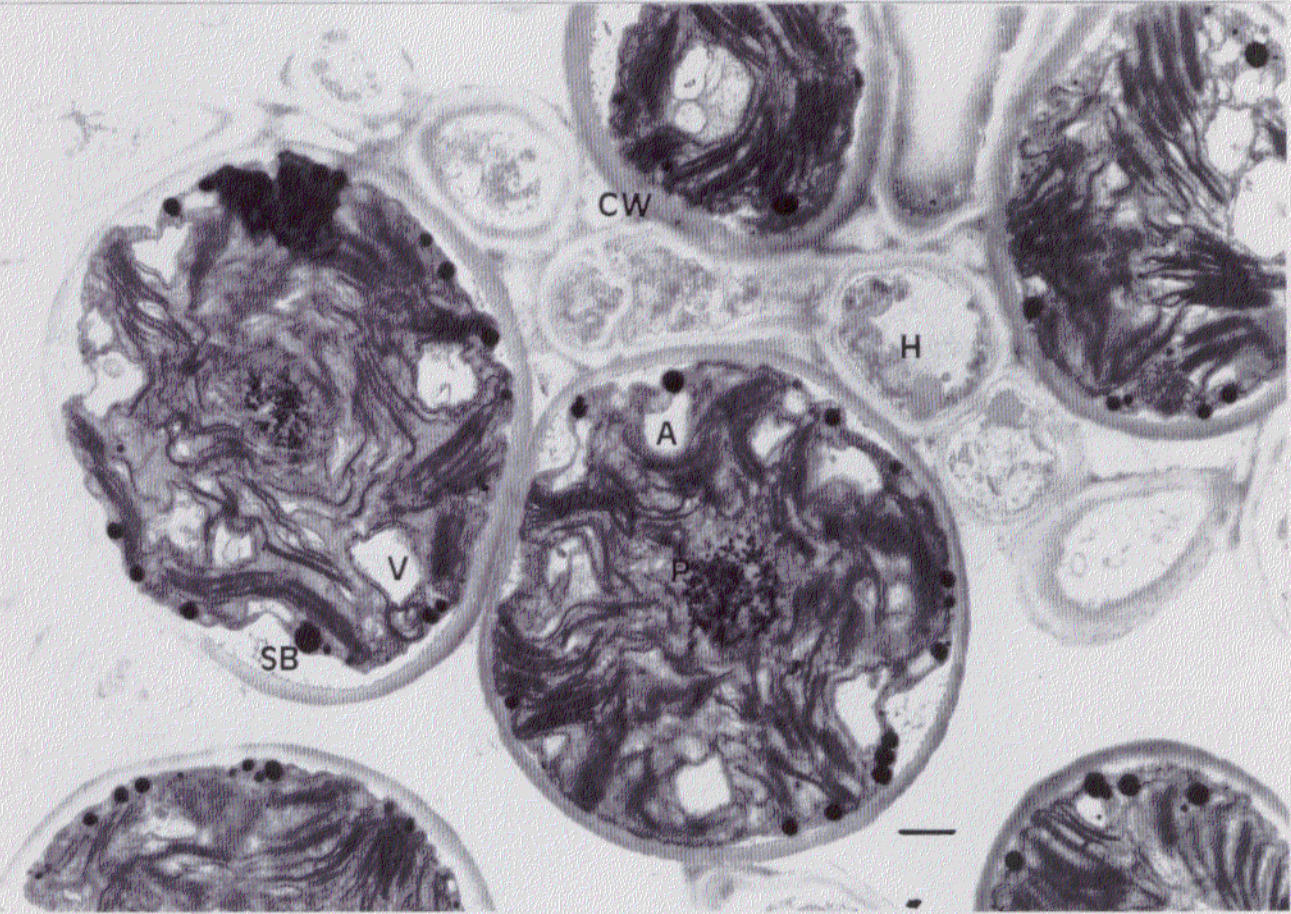


Fig. 23. Electromicrografías de talos de *X. parietina*. (A) Células del fotobionte, (B) Zona de contacto alga-hongo. La barra indica 1,0 μm . A, Alga; CH, cloroplasto; CW, pared celular; H, hifa; MT, matriz extracelular; P, pirenoide; PG, pirenoglóbulos; PL, plasmalema; SB, cuerpos de almacenamiento; TY, tilacoides; V, vacuola.

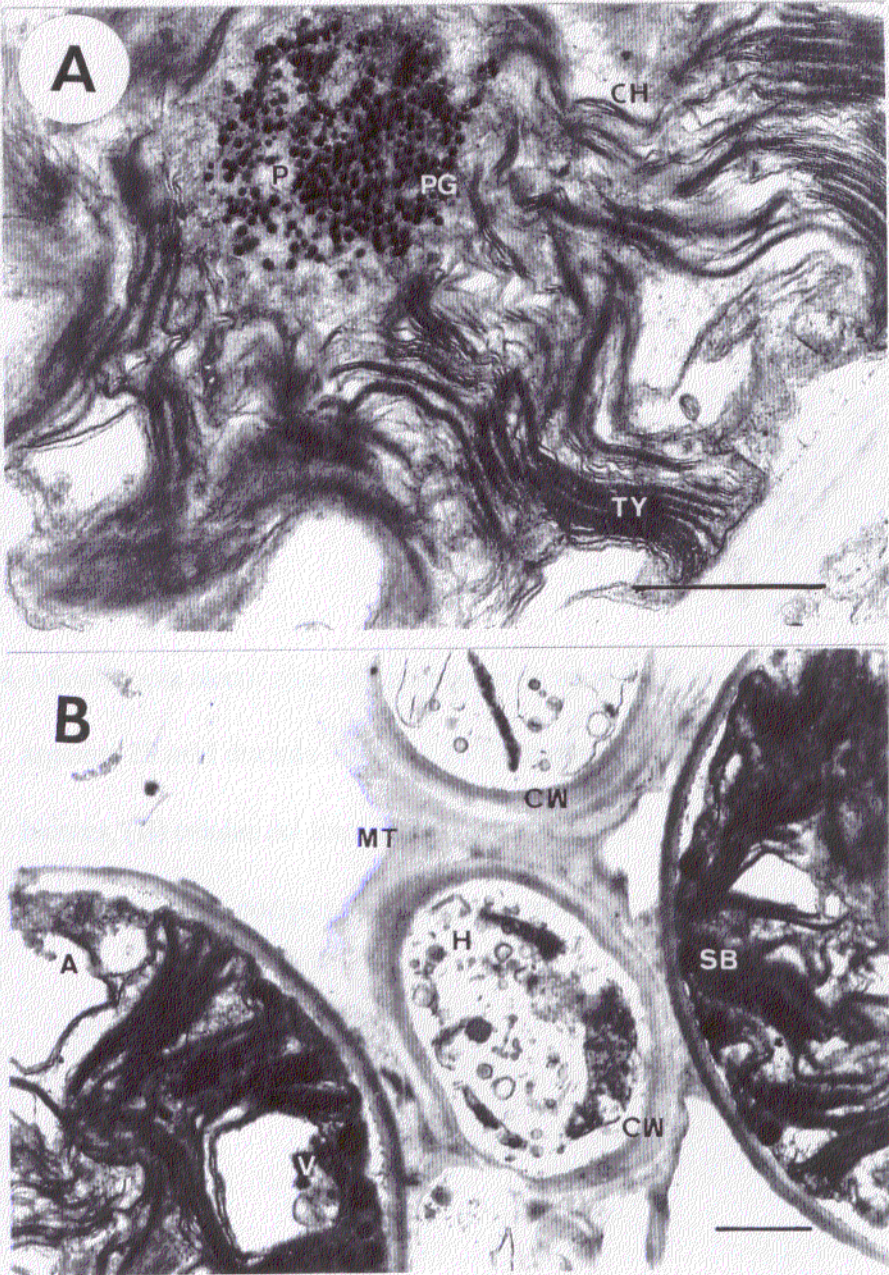


Fig. 24. Microscopía electrónica de transmisión de talos de *X. parietina* recolectados e incubados en arginina 28 mM durante 30 min a 26°C en oscuridad. (A) Zona de contacto entre ambos biontes, (B) células del fotobionte. La barra indica 1,0 μm . A, Alga; CW, pared celular; H, hifa; P, pirenoide; ST, cuerpos de almacenamiento.

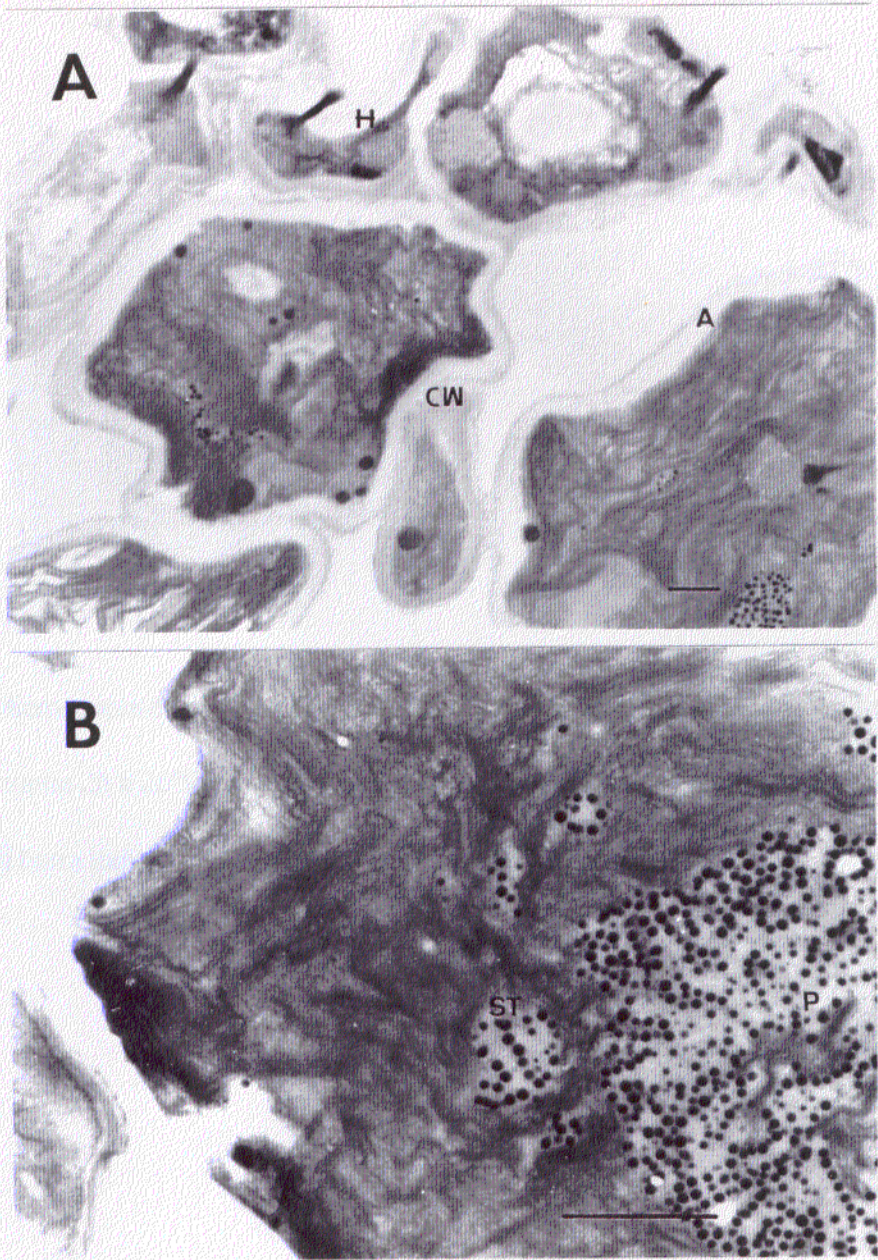


Fig. 25. Microscopía electrónica de transmisión de talos de *X. parietina* incubados en urea 100 mM durante 2h a 26°C en oscuridad. Visión general de la forma y distribución de los fotobiontes. La barra indica 1,0 μ m. A, alga; H, hifa; CW, pared celular.

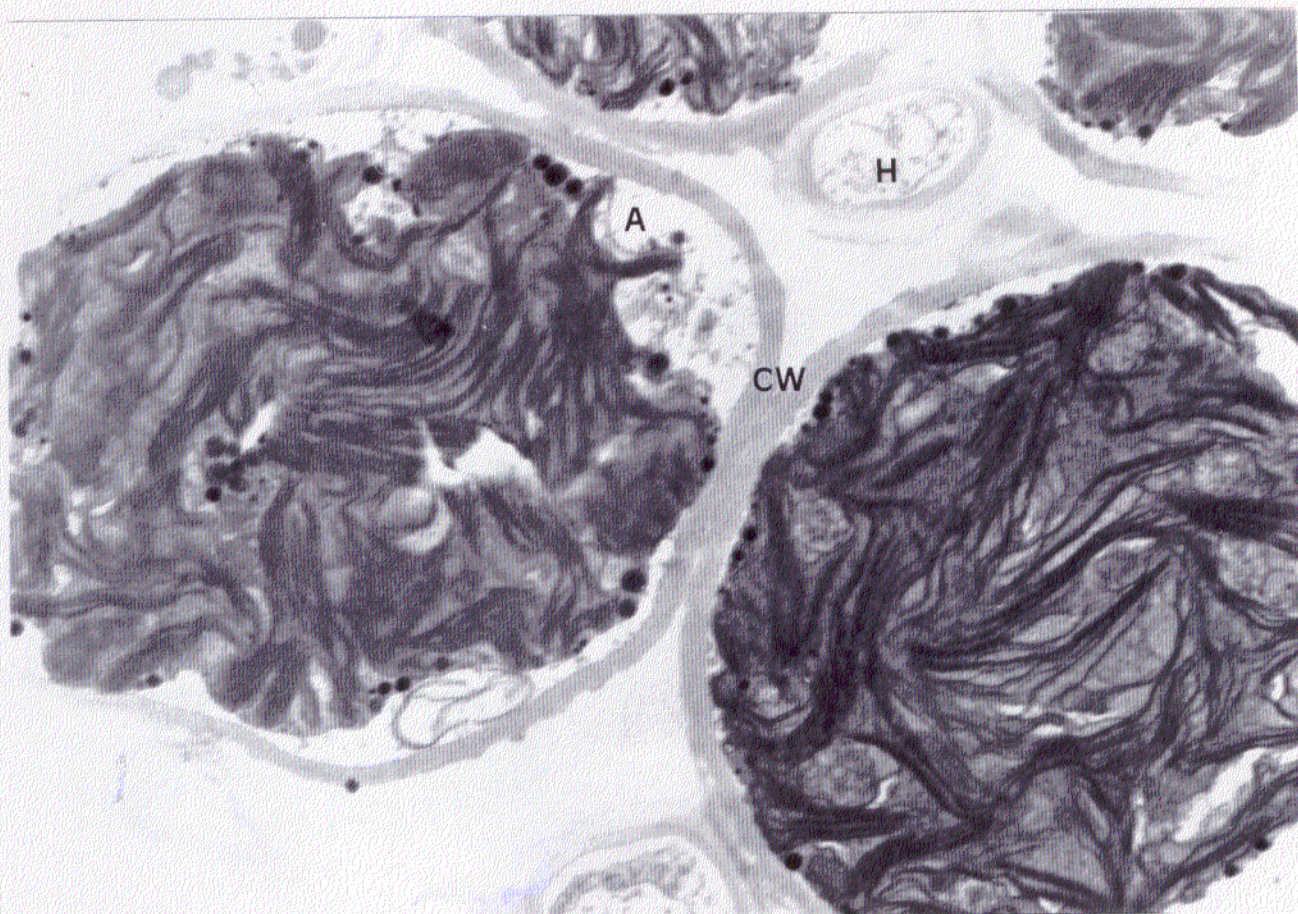


Fig. 26. Electrografía en detalle del talos tratados como se indico en la Fig. 25. (A) Interacción estrecha entre ambos biontes, observándose el inicio de un haustorio intraparietal, (B) pirenoide. La barra indica 1,0 μm . A, alga; CW, pared celular; H, hifa; P, pirenoide; PG, pirenoglóbulos; SB, cuerpos de almacenamiento.

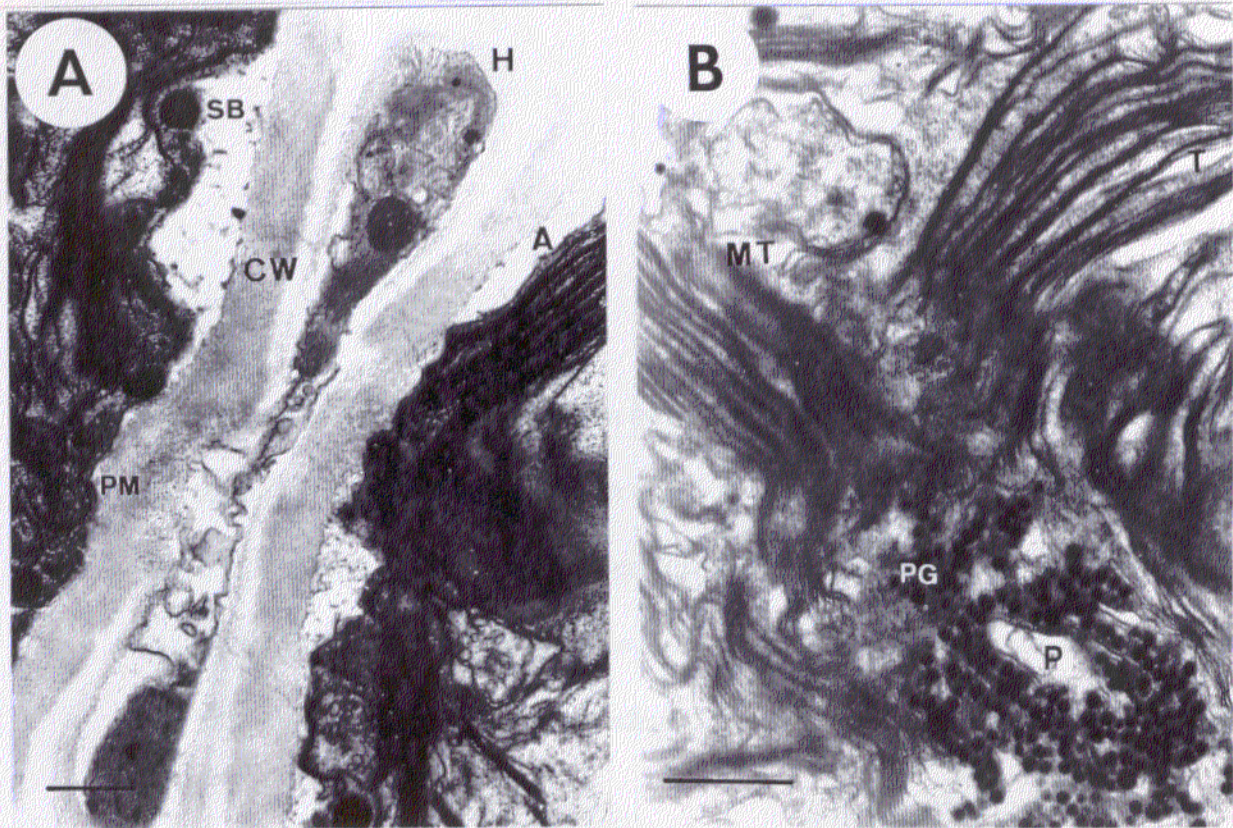


Fig. 27. Microscopía electrónica de transmisión de talos de *X. parietina* preincubados en arginina 28 mM durante 30 min, posteriormente en urea 100 mM durante 2h y por último, incubados en la lectina intratalina durante 18 h a 26 °C en oscuridad. (A) Zona de contacto alga-hongo, (B) Células del fotobionte, (C) pirenoide. La barra indica 1,0 µm. A, Alga; CH, cloroplasto; H, hifa; MT, matriz extracelular; P, pirenoide; PG, pirenoglóbulos, PL, plasmalema, TY, tilacoide.

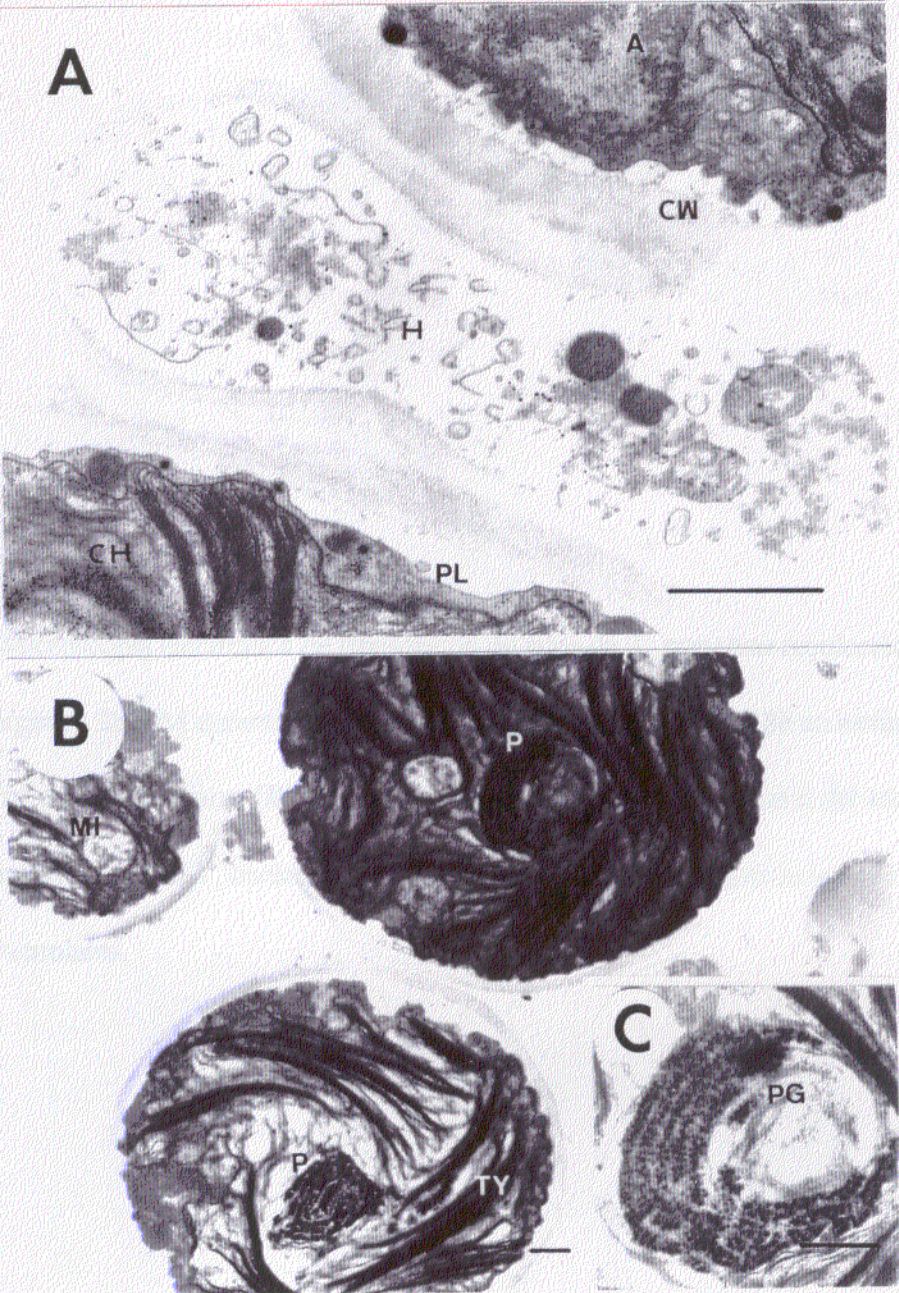


Fig. 28. Microscopía electrónica de transmisión de talos de *X. parietina* recolectados y cebados con arginina 28 mM durante 30 min y después incubados durante 18h en lectina intratalina. (A) Infección bacteriana, (B) haustorio intracelular, (C). Visión general del estado del talo. La barra indica 1,0 μ m. BT, bacteria; CW, pared celular; HA, prolongación haustorial; NS, estructuras vacuolares.

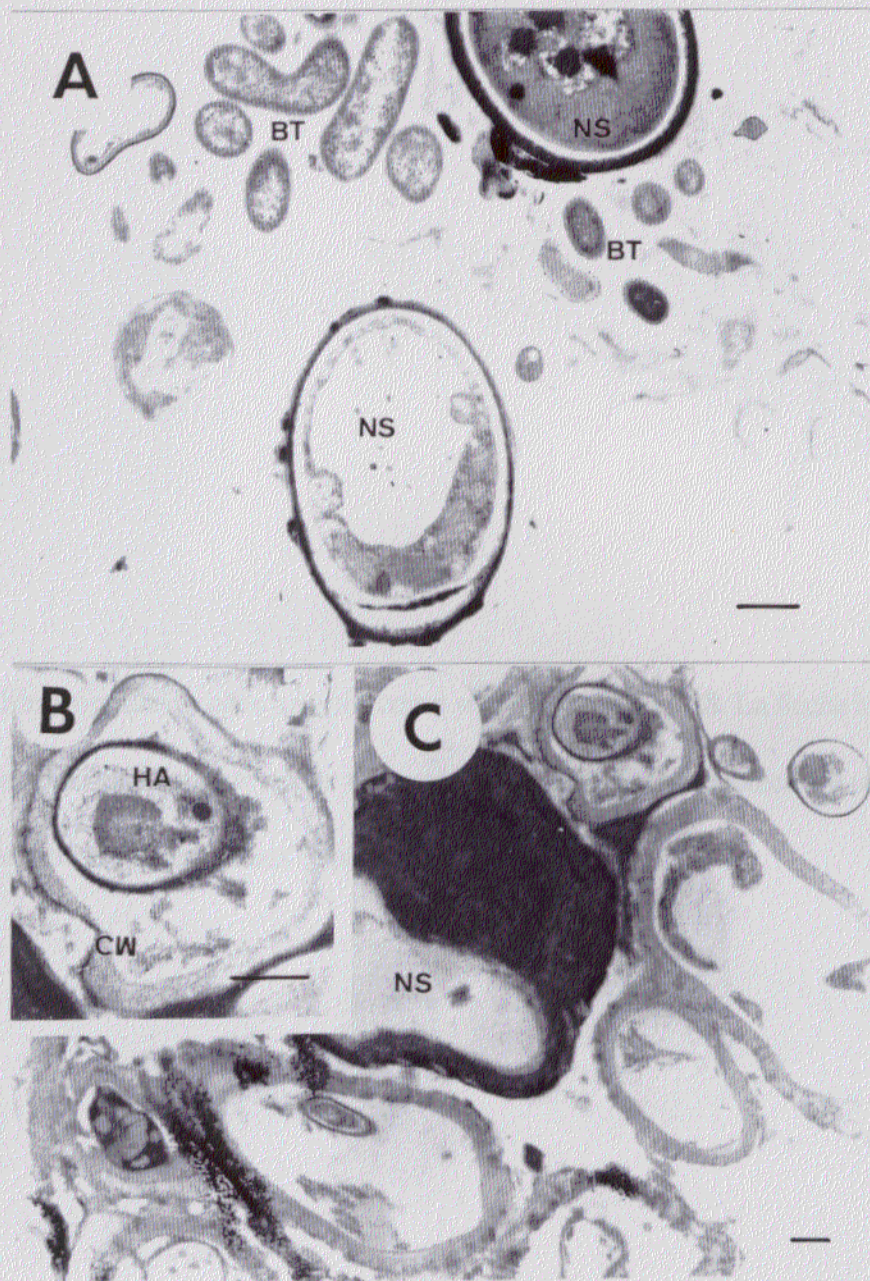


Fig. 29. Electrografía de talos tratados como se indicó en la Fig. 28. La flecha indica la presencia de una hifa en el interior celular en corte longitudinal. La barra indica 1,0 μm . HA, prolongacion haustorial; E, esqueletos celulares.

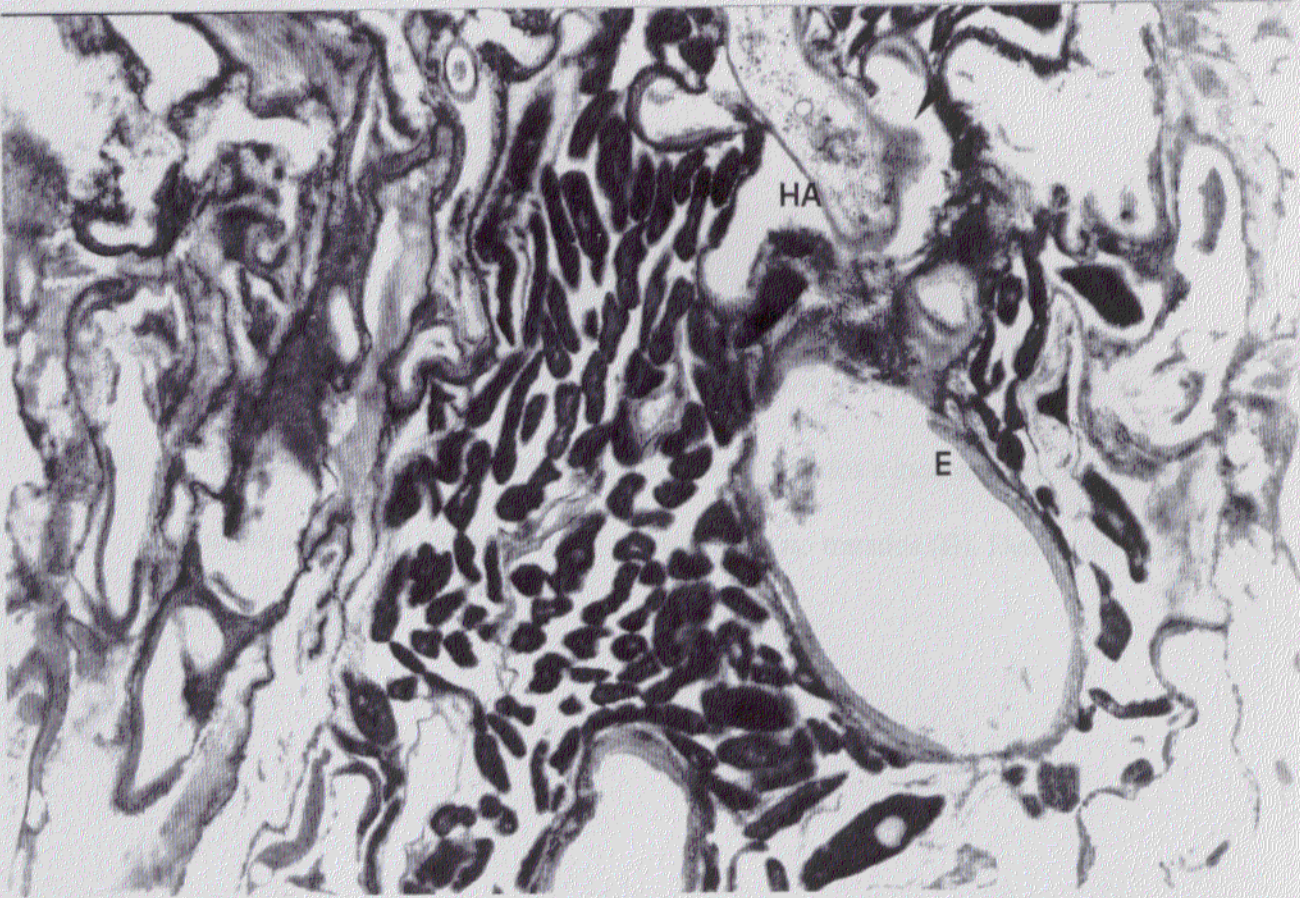


Fig. 30. Microscopia electrónica de barrido en fotobiontes aislados e incubados en urea 100 mM durante 4h a 26 °C en oscuridad (A) o fotobiontes no tratados (B). Detalle del control (C). La barra indica 10 μ m.

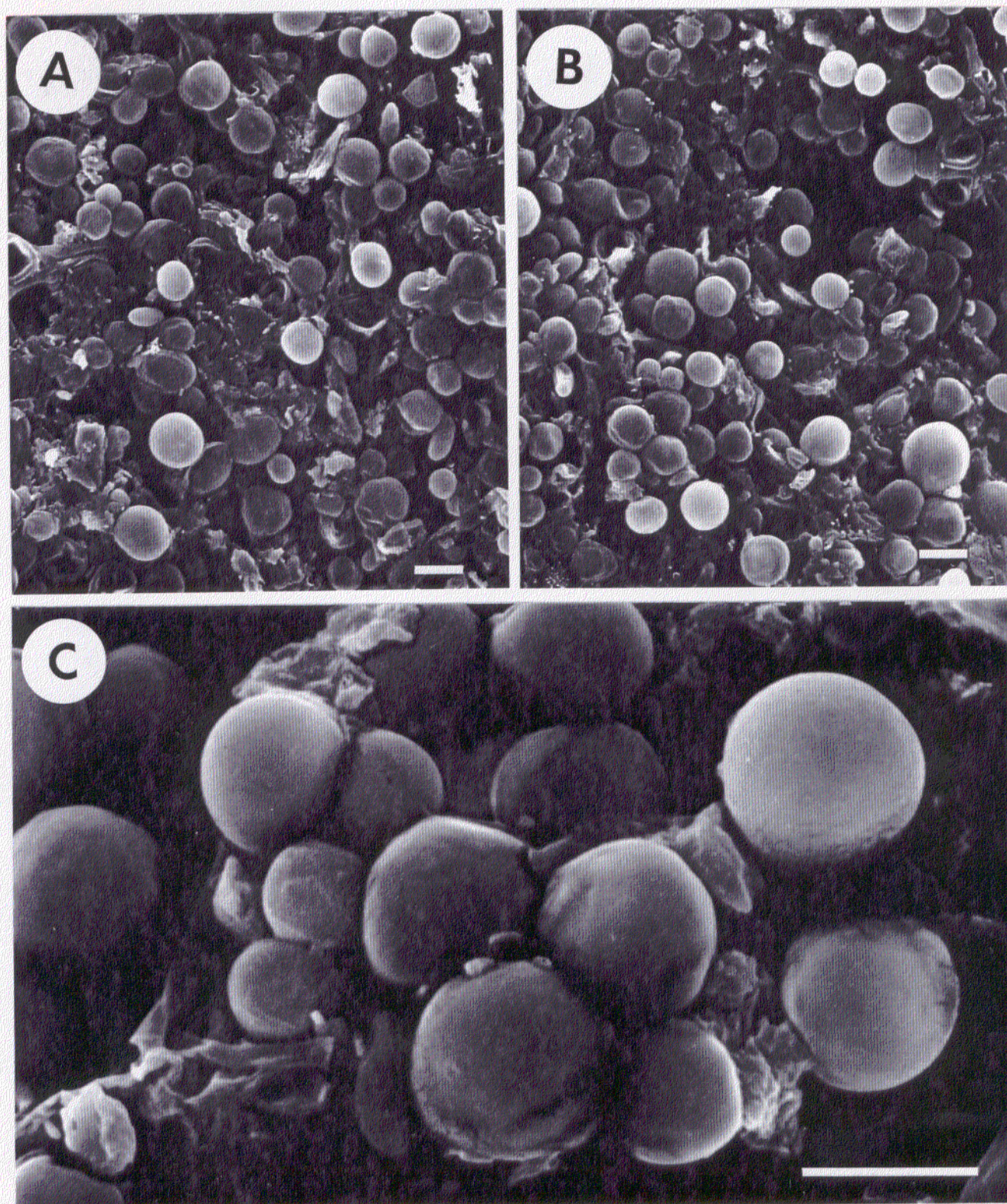


Fig. 31. Microscopía electrónica de transmisión de fotobiontes incubados en urea 100 mM durante 4h a 26°C en oscuridad. (A) Fotobionte típico, (B) Fotobionte con disposición helicoidal de tilacoides. La barra indica 1,0 μm . PL, plasmalema, TY tilacoides, SB, cuerpo de almacenamiento; CW, pared celular; V, vacuola.

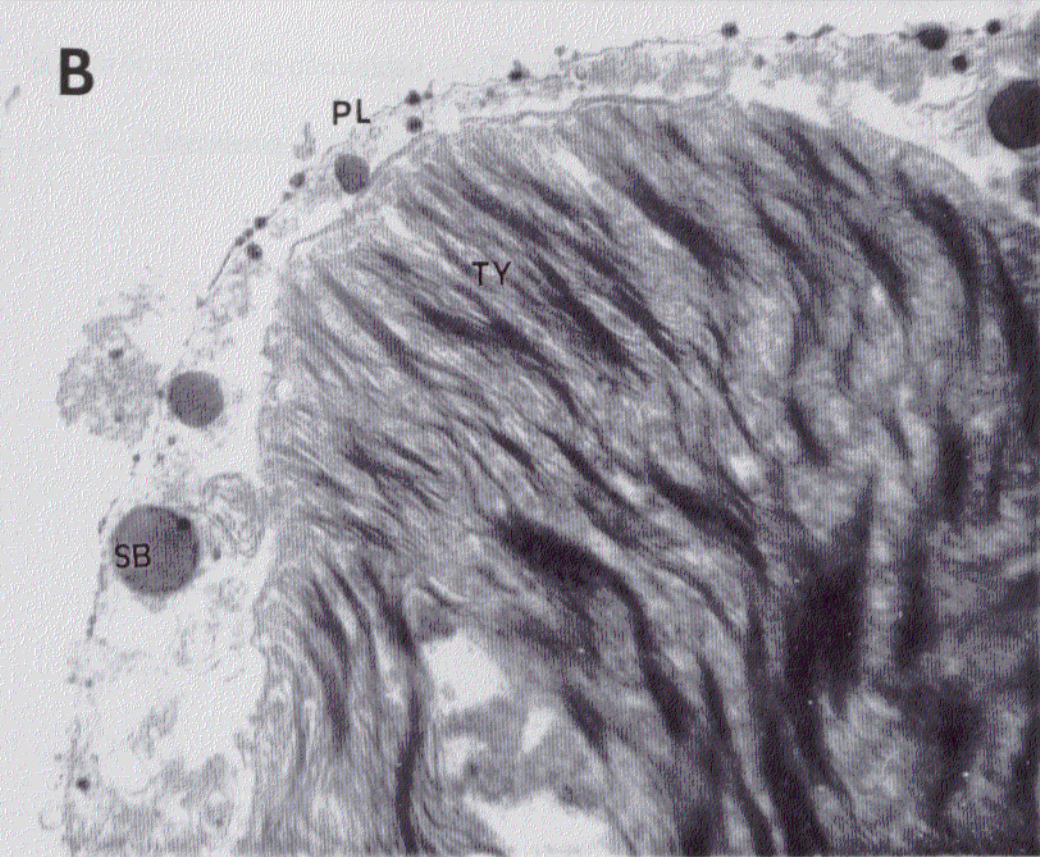
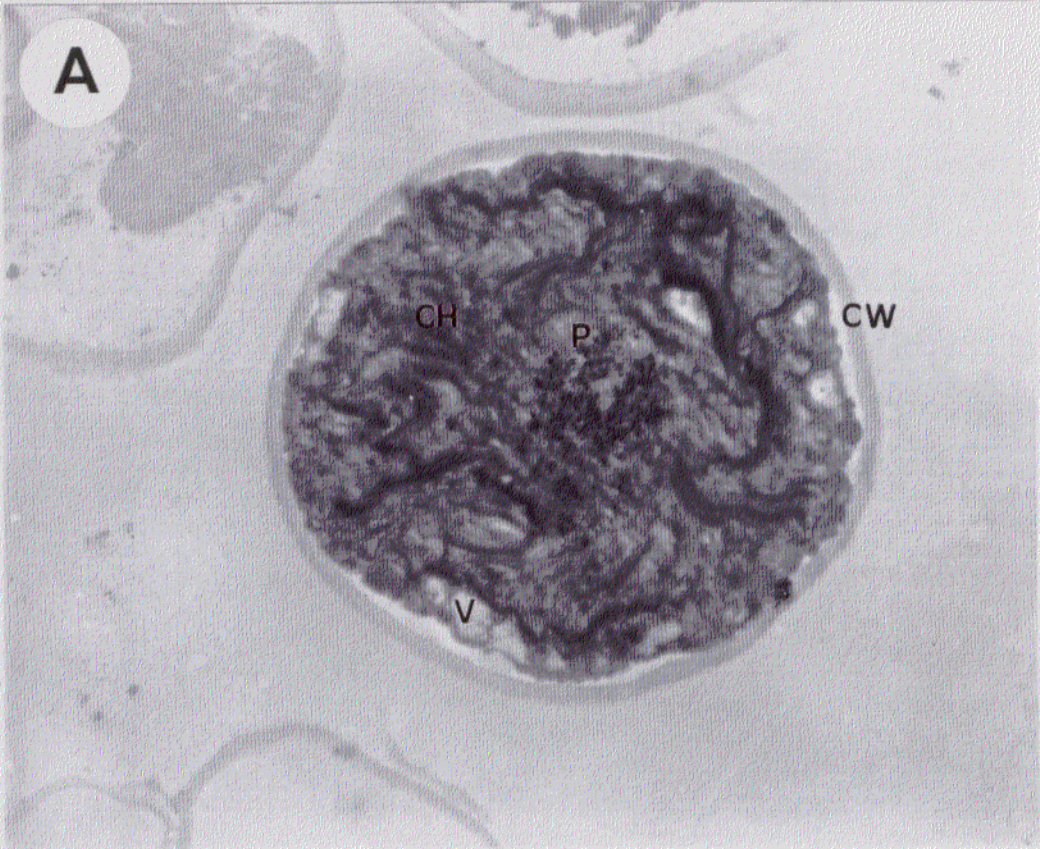
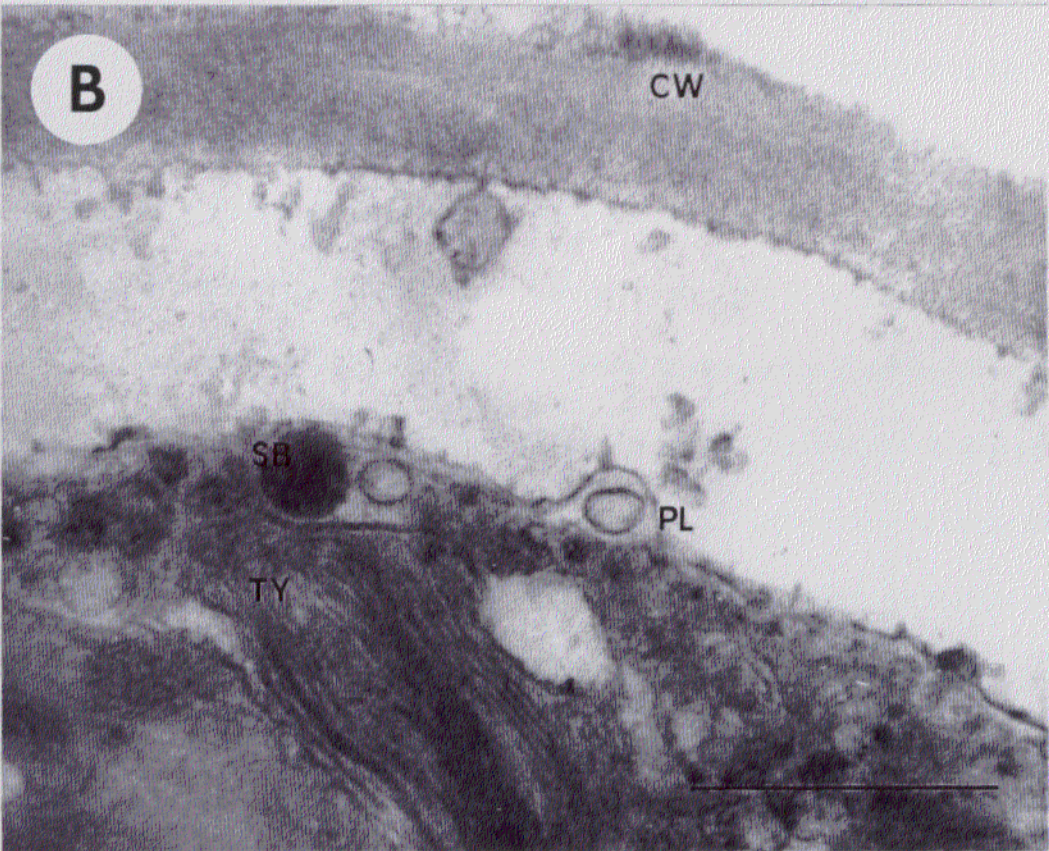
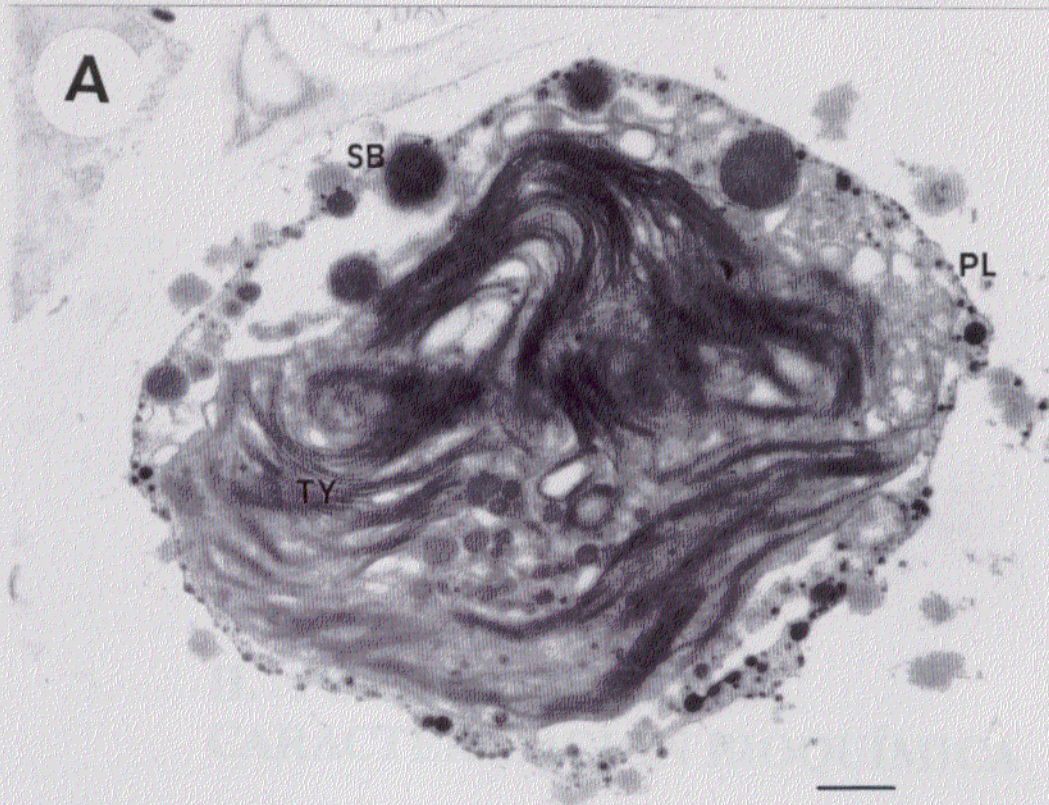


Fig. 32. Microscopía electrónica de transmisión de fotobiontes incubados en tampón PBS pH 7.4 durante 4h a 26°C en oscuridad. (A) Fotobionte, (B) Detalle estructural. La barra indica 1,0 μm . PL, Plasmalema, TY, tilacoides, SB, cuerpo de almacenamiento, CW, pared celular.



II. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Con objeto de establecer la capacidad de secreción al medio de la lectina intratalina, así como determinar la naturaleza bioquímica de esta proteína se purificaron y caracterizaron dos proteínas. Una de ellas, purificada a partir de talos de *Xanthoria parietina* fue la proteína intratalina (ABP) y la otra una proteína segregable purificada a partir del medio de cultivo (SA).

1.- PURIFICACION PROTEICA

1.1. Purificación de arginasa intratalina

Esta proteína con actividad arginasa fue purificada a partir de talos recién recolectados de *Xanthoria parietina* tal como se describe en el apartado 11.1 (Material y Métodos). La Tabla 6 recoge la cantidad y concentración de proteínas así como la actividad arginasa específica y la actividad total en los diferentes pasos de purificación. El rendimiento de purificación se presenta en porcentaje mientras que la purificación se refiere a número de veces respecto al extracto inicial. El comportamiento de elución en geles de fosfato cálcico se representó gráficamente (Fig. 33), obteniéndose un máximo de actividad específica en la fracción eluida con tampón 140 mM (43.69 unidades). El paso de la fracción 140 mM por una columna de Sephadex G-150 permitió obtener un rendimiento de purificación de 4,95%, purificando la proteína 73.39 veces (Tabla 6). El comportamiento de elución por Sephadex se recoge en la Fig. 34. La proteína eluyó en diferentes fracciones, incluso en el volumen muerto (87 ml). Todas las fracciones presentaron actividad arginasa. El comportamiento de elución mostró que las fracciones tienen mayor actividad específica según incrementa el volumen de elución.

Todas las fracciones fueron recogidas y analizadas en los estudios posteriores.

Tabla 6. Purificación de arginasa e intratalina (ABP) a partir de talos de *Xantoria Parietina* no tratados.

	Volumen (ml)	Concentración proteína (mg·ml ⁻¹)	Proteína total (mg)	Actividad específica (μmol amonio·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	Actividad total (μmol amonio·min ⁻¹)	Rendimiento %	Purificación (veces)
Extracto	135	0,417	56,29	1,6	90,06	100	—
Sobrenadante 40% saturación	144	0,082	11,81	2,92	34,48	38,28	1,82
Pella 60% saturación	60	0,063	3,78	4,73	17,88	19,85	2,96
Hidroxiapatita 140 mM	15	0,026	0,39	43,69	17,04	18,92	27,30
Sephadex G-150	5	0,0076	0,038	117,43	4,46	4,95	73,39

1.2. Purificación de arginasa segregable

Talos de *Xanthoria parietina* fueron incubados en arginina 40 mM en Tris-HCl 10 mM, pH 9,15, en luz y oscuridad a diferentes tiempos. Los medios de incubación se extrajeron cada hora y se analizó la actividad arginasa tal como se indicaba en el apartado 11.2.1 (Material y Métodos). La curva de actividad se recoge en la Fig. 35. Aquellos talos que fueron incubados en luz (Fig. 35.A) incrementaron la secreción de arginasa al medio en función del tiempo de incubación hasta alcanzar un máximo a las 2h de incubación (17,02 unidades). A partir de este tiempo, la actividad descendió hasta tomar valores mínimos a las 8 h (5,17 unidades).

Los talos que fueron incubados en oscuridad alcanzaron un máximo de actividad después de 1h de incubación (26,57 unidades). Esta actividad descendió después significativamente hasta las 6h de incubación a partir de lo cual se observó un cierto incremento de la actividad (20,93 unidades) y un descenso posterior hasta las 8 h de análisis (Fig. 35.B).

Dado que el máximo de secreción de arginasa se obtuvo después de 1 h de incubación en arginina 40 mM en Tris-HCl 10 mM, pH 9,15, en oscuridad, se establecieron estas condiciones para obtener el primer extracto proteico a partir del cual se purificó la arginasa segregable, tal como se indicó en el apartado 12.1 (Material y Métodos).

La Tabla 7 recoge la cantidad total y la concentración de proteínas así como la actividad enzimática total y específica en los diferentes pasos de purificación. Se presenta también el rendimiento de la purificación en porcentaje y el número de veces que se purificó la proteína.

Tras el fraccionamiento de la proteína en gel de fosfato cálcico, se tomó la fracción eluída con tampón Tris-HCl 180 mM, pH 9,15, puesto que en ésta se encontraba el máximo de actividad específica (Fig. 36). La filtración de esta fracción por Sephadex G-150 permitió purificar la proteína 66,00 veces con un rendimiento del 4,61%. La Fig. 37 muestra el comportamiento de elución de la

Tabla 7. Purificación de arginasa segregable (SA) a partir de talos de *Xantoria parietina* incubados en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 9,15

	Volumen (ml)	Concentración proteína ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Proteína total (mg)	Actividad específica ($\mu\text{mol amonio} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Actividad total ($\mu\text{mol amonio} \cdot \text{min}^{-1}$)	Rendimiento %	Purificación (veces)
Extracto	135	0,286	38,61	2,6	100,38	100	—
Sobrenadante 50% saturación	150	0,087	13,05	7,63	99,57	99,20	2,63
Hidroxiapatita 180 mM	100	0,003	0,30	54,20	15,36	15,30	19,69
Sephadex G-150	5	0,0054	0,027	171,60	4,63	4,61	66,00

proteína. Como se observa, el máximo de actividad específica se obtuvo en el volumen de elución 85 ml. El volumen muerto fue de 75 ml.

2.-CARACTERIZACION PROTEICA

La caracterización se realizó analizando diferentes parámetros bioquímicos tales como el punto isoelectrico, peso molecular, composición de aminoácidos, composición de monosacáridos del resto glicosidico y espectro de fluorescencia.

2.1. Determinación del punto isoelectrico

El punto isoelectrico se determinó por electroforesis capilar zonal, utilizando capilares de sílice fundida recubiertos de poliimida (Apartado 12.2, Material y Métodos). Todas las fracciones de ABP colectadas de la columna de Sephadex G-150 tuvieron aproximadamente el mismo valor de tiempo de migración siendo su valor medio $11,17 \pm 0,07$ min (Fig. 38.A.) La fracción colectada de Sephadex G-150 de la SA presentó un tiempo de migración de 10,21 min (Fig. 38.B). Los tiempos de migración se transformaron en movilidad electroforética, tal como se indicó en el apartado 12.2. El tampón, entre el marcador neutro (benzol) y las proteínas, eluyó con un tiempo de migración de 8,77 min.

Ambas proteínas migraron con carga negativa. La arginasa intratalina presentó un pI aproximado de $3,53 \pm 0.046$, mientras que para la arginasa segregable se estimó un pI aproximado de 4,54.

2.2. Determinación de la composición de aminoácidos

La composición de aminoácidos se determinó a partir de las fracciones de elución en Sephadex G-150 mediante el análisis de los productos obtenidos por hidrólisis ácida durante 24 h. La Tabla 8 recoge los nmoles y el porcentaje de aminoácidos para ambas proteínas. Tanto la ABP como la SA

Tabla 8. Análisis de aminoácidos de arginasa intratalina (ABP) y arginasa segregable (SA). La tabla muestra el porcentaje y los nmoles obtenidos de cada aminoácidos.

Aminoácidos	Arginasa intratalina		Arginasa segregable	
	nmoles	%	nmoles	%
Cys*	1,20	1,25	0,87	1,13
Asx	8,78	9,15	7,63	9,88
Thr	3,26	3,40	2,75	3,56
Ser	11,38	11,86	11,26	14,58
Glx	14,92	15,55	13,93	18,04
Pro	2,30	2,40	1,86	2,41
Gli	30,05	31,32	17,29	22,39
Ala	6,08	6,34	5,51	7,13
Val	2,68	2,79	2,10	2,72
Met	0,15	0,16	0,13	0,17
Ile	1,32	1,38	1,12	1,45
Leu	1,95	2,03	1,62	2,10
Tyr	1,23	1,28	0,83	1,07
Phi	0,98	1,02	0,26	0,34
His	4,34	4,52	4,85	6,28
Lys	2,08	2,17	2,22	2,87
Arg	3,23	3,37	3,00	3,88
Tryp**	0,51		0,38	
Total	96,44	100	77,23	100

* Determinado como ácido cistéico

** Determinado espectrofotométricamente por el método Beaven-Hollday

tienen un elevado porcentaje de Asx y Glx. La ABP presenta un 9,10% de Asx y un 15,47% de Glx, mientras que la SA muestra un 9,83% de Asx y un 17,95% de Glx. Fueron igualmente frecuentes los aminoácidos polares tales como la Ser y la Gly alcanzando valores de 11,80% y 31,16% respectivamente para la ABP y valores de 14,51% y 22,28% para la SA. Ambas proteínas presentaban una composición idéntica si bien algunos aminoácidos marcaron diferencias cuantitativas. Los más importantes fueron Gly, Glx, Ala, Phe, His. La Cys representaba el 1,24% y 1,12% en la ABP y la SA, respectivamente.

2.3. Determinación de pesos moleculares

El peso molecular de las proteínas se determinó mediante electroforesis en poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes con SDS al 0,1%. La Fig. 39 muestra dicha electroforesis donde se observó que ambas proteínas se resolvían en una sola banda de 58,6 kDa. Las proteínas no se resolvieron en electroforesis nativa probablemente por la formación de agregados de alto peso molecular.

2.4. Determinación de los monosacáridos del resto glicosídico

La elución de algunos patrones de monosacáridos por columna de alúmina neutra se llevó a cabo utilizando como fase móvil agua destilada y filtrada. Los resultados se muestran en la Fig. 40. Fructosa, glucosa, manosa y glucosamina eluyeron en la fracción 2 (volumen de elución 10 ml) mientras que la galactosa y la fucosa eluyeron en la fracción 3 (volumen de elución 15 ml). La fracción que contenía la mayor cantidad del correspondiente monosacárido fue cromatografiada por HPLC. Las Fig. 41 y 42 muestran dos ejemplos de la purificación de los patrones. El patrón de galactosa (Fig. 41.A) se resolvió en dos picos mayoritarios con tiempos de retención de 2,82 y 3,25 min. Sin embargo, tras la filtración por columna de alúmina (fracción 3), se resolvió en un único pico, con un tiempo de

retención de 2,86 min (Fig. 41.B.). La sustancia contaminante podría ser fructosa ($t_r=3,26$) o N-acetil-galactosamina ($t_r=3,24$). Una alícuota de esta fracción 3 fue incubada con 1,0 mg de galactosa oxidasa durante 30 min a 30°C confirmándose la formación de la correspondiente D-galacto-hexodialdosa.

El patrón de glucosa se resolvió en tres picos principales 2,05 min, 3,10 min y 4,87 min (Fig. 42. A). Después de la filtración por columna de alúmina (fracción 2) y posterior análisis por HPLC, el cromatograma reveló un sólo pico de 4,93 min (Fig. 42. B). Las sustancias contaminantes fueron identificadas como N-acetil-D-glucosamina ($t_r=3,04$) y ácido glucurónico ($t_r=2,03$). Esta fracción fue sustrato óptimo para la glucosa oxidasa puesto que se confirmó la formación de ácido glucurónico. Los patrones de N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-galactosamina se revelaron como sustancias puras por HPLC antes y después del filtrado por columna de alúmina.

La Tabla 9 muestra los valores de tiempo de retención para los diferentes patrones tras la filtración. El pico con un tiempo de retención de 1,3 min se identificó en todos los casos como acetonitrilo (componente de la fase móvil). Previo al análisis por HPLC, 1,0 ml de la fracción purificada de SA fue sometido a hidrólisis ácida en presencia de fenol 5% con objeto de verificar la naturaleza glicosilada de la SA, tal como se realizó con la ABP parcialmente purificada. Transcurrido el tiempo de reacción, la variación colorimétrica a 490 nm se interpoló en la correspondiente recta patrón estimándose un valor de 2,97 mmol de hexosa por mg de proteína.

La Fig. 43 muestra el cromatograma obtenido del análisis de ABP tras la hidrólisis ácida detectándose dos picos de tiempo de retención 3,10 min y 4,97 min (Fig. 43.A). Tras cebar con los diferentes patrones, el pico 3,10 sólo incrementó cuantitativamente después de incorporar a la muestra analizada N-acetil-D-glucosamina (Fig. 43.B.) mientras que el pico a 4,97 min sólo incrementó cuando se suministró a la muestra D-glucosa (Fig. 43.C). La Figura 44 muestra el cromatograma tras hidrólisis ácida de la SA. Se revelaron dos picos principales con tiempos de retención 2,94 min y 4,98 min (Fig. 44.A). Este último pico incrementó cuantitativamente cuando la muestra se cebó con D-glucosa (Fig.

Tabla 9. Tiempos de retención tras análisis por HPLC de distintos monosacáridos patrón previamente purificados por filtración a través de columna de alúmina neutra.

Patrones	Tiempo de retención (min)
N-acetil-D-galactosamina*	3,24
N-acetil-D-glucosamina*	3,04
Glucosamina	3,65
Galactosa	2,86
Glucosa	4,93
Fructosa	3,26
Fucosa	2,70
Manosa	3,49
Acido glucurónico	2,03

* Monosacáridos que no necesitaron purificación puesto que el análisis previo a la filtración mostró un único pico, sin sustancias contaminantes.

44.B). Dos picos bien definidos aparecieron después de incluir en la muestra de análisis N-acetil-D-glucosamina ($t_r = 3,10$ min), uno de ellos a 2,92 min y el otro a 3,14 min (Fig. 44.C). El pico de 2,92 min sólo incrementó cuando se incorporó a la muestra galactosa (Fig. 44.D).

Los picos de D-galactosa y N-acetil-D-glucosamina fueron separados con una alta resolución después del análisis cromatográfico de una mezcla equimolar de ambos patrones (Fig. 44.E). La respuesta del detector muestra un comportamiento lineal en el rango desde 0.01 mg a 2,5 mg de masa inyectada (Fig. 45), aunque la sensibilidad para la N-acetil-D-glucosamina fue de aproximadamente 50 veces mayor que la encontrada para glucosa. El error inherente al calibrado directo fue estimado como desviación típica en seis repeticiones de inyección por cada concentración de solución patrón.

2.5. Espectros de fluorescencia

La Fig. 46 muestra los espectros de fluorescencia de ABP y SA utilizando como longitud de excitación 257 nm. Tres máximos de emisión se observaron en ambos casos. El espectro de ABP tenía un máximo de emisión a 417,5 nm correspondiente a la emisión de fluorescencia de Trp, otro a 347,5 nm propio de Tyr y por último el máximo de emisión de Phe a 292,5 nm. Las características espectrales de SA fueron similares si bien se observó un "hombro" a 445 nm en el pico correspondiente a Trp y un desplazamiento de aproximadamente 10 nm en el máximo de Tyr y Phe hacia el rojo.

3.- INTERACCION ENTRE AMBAS LECTINAS Y EL RECEPTOR UREASA

Dado que se caracterizaron dos arginasas glicosiladas de naturaleza ácida, que diferían sustancialmente en el resto glicosílico, se analizó la afinidad de dicha proteína por el receptor de pared. Las proteínas se marcaron con fluoresceína tal como se indicó en el apartado 4.1. (Material y Métodos). Con objeto de establecer la longitud de onda a la que emiten las proteínas marcadas, se construyó el espectro de absorbancia y el de emisión de la fluoresceína (Fig. 47). Como se observa en el

espectro realizado entre 350 y 500 nm, el máximo de absorbancia fue de 400 nm (Fig. 47. A.). Cuando las muestras fueron excitadas con luz de esta longitud de onda, las proteínas fluorescentes emitieron luz de 490 nm de longitud de onda (Fig. 47.B). Por esta razón , los análisis de afinidad se realizaron con esta longitud de onda.

3.1. Análisis de afinidad por fluorimetría

Fotobiontes recién aislados y previamente inducidos con urea 100 mM durante 4h fueron incubados con ABP y SA marcada durante 3h. Tras lavado de las células, aquellas preincubadas con ABP fluorescente se incubaron con SA no marcada y las incubadas con SA fluorescente se trataron con ABP no marcada, en ambos casos durante 3h. La Tabla 10 recoge el porcentaje de fluorescencia obtenido en los sobrenadantes tras centrifugar las algas después de la última incubación. Como se observa, la SA fue más efectiva en el desplazamiento de ABP que la ABP en el desplazamiento de SA, puesto que el porcentaje de fluorescencia recuperado en el primer caso (61%) es mayor que en el último ensayo (42%).

3.2. Análisis de afinidad por microscopía de fluorescencia

Fotobiontes recién aislados e inducidos tal como se indicó en el apartado anterior fueron incubados con SA y ABP fluorescentes durante 3h. La Fig. 48.B muestra fotobiontes inducidos con urea 100 mM durante 4h con fluorescencia amarilla tras la unión con ABP purificada y marcada con fluoresceína frente a fotobiontes incubados igualmente con ABP fluorescente. Se prepararon ensayos de incubación cruzada con proteínas marcadas y no marcadas, como se indicó anteriormente. Tras el lavado abundante de las células, se realizaron preparaciones en fresco para su observación por microscopía de fluorescencia.

La Tabla 11 recoge el número de células con fluorescencia amarilla y el total de células contabilizadas en cinco campos tomados al azar, así como el porcentaje de células fluorescentes

Tabla 10. Porcentaje de fluorescencia amarilla de las distintas glicoproteínas marcadas con fluoresceína y recuperadas en el sobrenadante tras los ensayos de desplazamiento. La cantidad de ABP o SA utilizadas fueron 41 μ g.

Preincubación (3h)	Incubación (3h)	% Fluorescencia
ABP ^{Fl}	SA	61
SA ^{Fl}	ABP	42

^{Fl} Proteínas (ABP o SA) marcadas con fluoresceína

Tabla 11. Porcentaje y número de fotobiontes de *Xanthoria parietina* con ABP^{Fl} o SA^{Fl} unida a su pared (fluorescencia amarilla positiva).

Tratamiento		Algas		
Preincubación	Incubación	Fluorescencia amarilla +		Total
		número	%	número
-	SA ^{Fl}	198	87,6	226
-	ABP ^{Fl}	170	76,9	221
ABP	SA ^{Fl}	135	81,3	166
SA	ABP ^{Fl}	60	25,0	240

^{Fl} Proteínas (ABP o SA) marcadas con fluoresceína

amarillo positivas. Tras los análisis estadísticos aplicados al número de células con fluorescencia (Tabla 12), se estableció la unión diferencial entre ABP y SA al receptor de pared, dado que el número de células fluorescentes, tras incubar con SA marcada, era significativamente mayor que el número de células detectadas al incubar con ABP fluorescente. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas si se comparan los cultivos con SA marcada, es decir células preincubadas con ABP no marcada y posteriormente con SA fluorescente frente a células incubadas directamente con SA marcada. Sin embargo, cuando las células que tenían unida a su pared SA no marcada se incubaron con ABP marcada, el porcentaje de células fluorescentes amarillo positivas fue claramente inferior al resto de los tratamientos. Igualmente, los resultados obtenidos al comparar las dos reacciones cruzadas muestran diferencias estadísticamente significativas.

Estos resultados revelan que la unión de las dos isoformas de arginasa al receptor de pared es diferencial y que la capacidad de desplazamiento en la unión es mayor para la SA que para la ABP, dado que, cuando los receptores están ocupados por SA, el porcentaje de células fluorescentes obtenido al incubar con ABP marcada es muy bajo (25%). Sin embargo, cuando es la ABP la que ocupa los receptores, la SA marcada es capaz de desplazarla, obteniéndose un porcentaje de células fluorescentes del 81,3%, similar al porcentaje obtenido cuando los receptores no están ocupados y se incuban los fotobiontes con SA marcada (87,6%). Por último, la ABP fluorescente es capaz de unirse a células inducidas sólo en el 76,9% de los casos a pesar de que los receptores estén previamente libres (Tabla 11).

Conviene señalar que el porcentaje de fluorescencia amarilla obtenida cuando los fotobiontes fueron inducidos en urea 100 mM durante 2h e incubados con la lectina parcialmente purificada y marcada con fluorescencia era de 33% (Tabla 3).

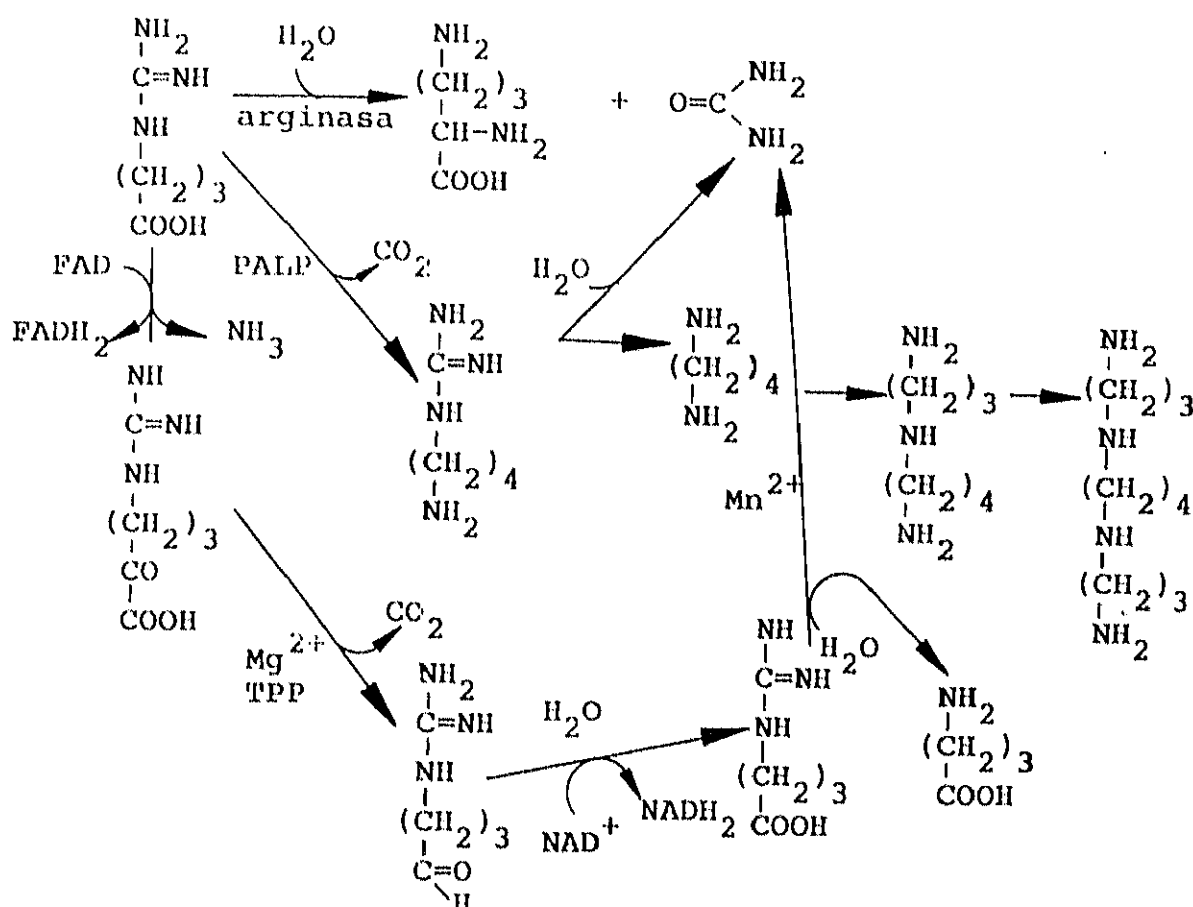
Tabla 12. Análisis estadístico de los resultados numéricos obtenidos en la Tabla 11 comparando los distintos tratamientos mediante χ^2 contingencia.

Tratamiento	χ^2 contingencia	Significación
SA ^{Fl} / ABP ^{Fl}	13,3	**
SA ^{Fl} / ABP → SA ^{Fl}	4,3	-
SA ^{Fl} / SA → ABP ^{Fl}	14,0	**
ABP ^{Fl} / ABP → SA ^{Fl}	1,8	-
ABP ^{Fl} / SA → ABP ^{Fl}	20,0	**
ABP → SA ^{Fl} / SA → ABP ^{Fl}	6,6	**

^{Fl} Proteínas (ABP o SA) marcadas con fluoresceína

** p<0,01

3.3. Analisis de poliaminas libres y conjugadas



El esquema anterior muestra la síntesis de poliaminas a partir de la arginina como aminoácido sustrato. Como se observa, una de las enzimas implicadas es la arginasa (o L-arginina aminohidrolasa) que rinde ornitina y urea como producto. La descarboxilación de ornitina por una ornitina descarboxilasa produce putrescina como poliamina, precursora del resto de las poliaminas en líquenes. Tras la incorporación de arginina procedente del medio en el fotobionte (Fig. 14), se valoró por HPLC la concentración de poliaminas intracelulares así como el efecto de la entrada o retención a nivel de la pared de las dos isoformas de arginasa, ABP y SA. La cuantificación en la concentración de poliaminas se realizó por interpolación de los valores de cuentas de área en rectas patrón de putrescina,

espermidina y espermina (Fig. 49) verificando el comportamiento lineal del detector en los rangos de masa inyectada.

El contenido inicial de putrescina libre (fracción S) en las algas fue relativamente bajo, aproximadamente $15 \text{ mg} \times \text{g}^{-1}$ (Fig. 50). La cantidad de putrescina no se modificó cuando las células fueron incubadas durante 3h en SA o ABP. Sin embargo, apareció un incremento en la concentración de putrescina conjugada a macromoléculas insolubles en agua (Fracción PH) cuando las células se trataron con SA (Fig. 51). Este incremento no se observó en las tratadas con ABP. Cuando las células fueron preincubadas únicamente con arginina, se observó un aumento en la cantidad de putrescina PH, que no se detectó en la fracción S. Sólomente cuando las células incrementaban la concentración de este aminoácido (Fig. 14) y se incubaban posteriormente con las isoformas de arginasa se detectó un incremento en la concentración de putrescina libre (Fig. 50). Por otra parte, el contenido de putrescina-SH incrementó 2,38 veces en relación con el control cuando las células cargadas con arginina fueron incubadas con SA.

Estos incrementos de la concentración de putrescina libre o conjugada a macromoléculas insolubles en agua no se observaron cuando las células presentaban en su pared actividad ureasa o dicho de otra forma, cuando la unión específica receptor (ureasa)-ligando (isoforma) se llevaba a cabo.

La espermidina fue la poliamina libre más importante desde el punto de vista cuantitativo, obteniéndose valores de $50 \text{ mg} \times \text{g}^{-1}$ en fotobiontes recién aislados. Esta concentración de espermidina disminuyó en todo los tratamientos a los que fueron sometidos los fotobiontes (Fig. 52). Elevadas concentraciones de espermidina se obtuvieron también en el control al analizar la fracción SH (poliaminas conjugadas a macromoléculas solubles en ácido), como muestra la Fig. 50. El mismo comportamiento de disminución drástico se observó en esta fracción cuando los fotobiontes eran sometidos a cualquier tipo de incubación. Incluso, en algunos casos, no se detectó poliamina. En el liquen *Xanthoria parietina* no se detectó putrescina o espermina ligada a macromoléculas solubles en

agua (Fig. 52). Por otra parte, no se detectó espermina libre o ligada en ninguna de las fracciones analizadas a excepción de los fotobiontes tratados con SA (Fig. 50) que presentaron valores relativamente altos de espermina ($10 \text{ mg} \times \text{g}^{-1}$).

3.4. Análisis de clorofilas endógenas

El tratamiento de los fotobiontes tal como se indicó anteriormente así como la incubación directa de algas recién aisladas en putrescina 10 mM no produjo en ningún caso un aumento de la actividad clorofilasa puesto que no se detectó la aparición de producto (clorofilida) por HPLC tal como muestra la Fig. 53.

3.5. Ensayos de ligamientos isolectina-receptor

30 ml ($1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$) de ambas isoformas fueron incubadas con eritrocitos humanos del grupo B a fin de verificar la capacidad de hemaglutinación de estas proteínas. En paralelo, se prepararon controles incubando eritrocitos humanos en suero fisiológico.

La Fig. 54 muestra las microfotografías obtenidas tras la observación microscópica a diferentes tiempos de incubación. La Fig. 54.A y 54.B muestran los eritrocitos inmediatamente después de incorporar al medio de incubación ABP (Fig. 54.A) y SA (Fig. 54.B). Tras 5 min de incubación, se observaron claramente los primeros nódulos de aglutinación tanto en la incubación con arginasa intratalina (Fig. 54.C) como con arginasa segregable (Fig. 54.D). Los eritrocitos se movían en dirección a los primeros nódulos en ambas incubaciones, observándose grandes nódulos tras 15 min de observación tanto para ABP (Fig. 54. E) como para SA (Fig. 54.F). Los glóbulos rojos que fueron incubados en suero salino no presentaron aglomeraciones celulares tras 15 min de observación microscópica.

3.6. Efecto de la unión en la actividad enzimática de paredes

Las proteínas purificadas fueron incubadas con fotobiontes aislados incubados en urea y (por tanto con ureasa en su pared) y con fotobiontes no inducidos. Tras el período de incubación, se aislaron las paredes celulares, valorando la actividad ureasa en pared. Fotobiontes recién aislados y fotobiontes incubados únicamente en urea 100 mM durante 4h se prepararon como controles. La Fig. 55 muestra la actividad específica ureasa en pared. Como se observa claramente, cuando los fotobiontes fueron incubados en urea presentaron una alta actividad específica que se anuló completamente tras incubación con SA y descendió en un 97,95% tras incubar con ABP. No se observó actividad ureasa en fotobiontes no sometidos a inducción.

Se prepararon alícuotas de los ensayos anteriores en fresco y se observaron al microscopio óptico. La Fig. 56 muestra los resultados tras la observación de la células incubadas con SA. Los fotobiontes incubados con urea durante 4h (Fig. 56.B) no presentaron diferencias morfológicas cuando se compararon con el control (Fig. 56.A). Igualmente, cuando las células fueron incubadas con ABP tras inducir el receptor en pared no se observaron diferencias apreciables con el control (Fig. 56.C). Sin embargo, la incubación de los fotobiontes directamente con la proteína durante 5h provocó daños a nivel de la pared celular (Fig. 56.D). Estos daños favorecieron la pérdida del contenido citoplasmático (Fig. 56.E) así como la plasmolisis celular y la formación de fantasmas cuyo contenido citoplasmático se observaba en el medio de incubación alrededor de las células dañadas (Fig. 56.F).

Cuando se realizaron tratamientos análogos usando arginasa intratalina, se observaron también resultados similares (Fig. 57). Si la ABP no estaba presente en el medio de incubación (Fig. 57.A y 57.B) o si no había penetrado en el interior celular (Fig. 57.C), no se observaron daños estructurales. Sin embargo, se observaron rotura de pared y pérdida del contenido citoplasmático cuando las células se trataron con ABP y ésta pudo penetrar en el citoplasma celular (Fig 57.D, 57.E y 57.F).

En paralelo, se analizó la actividad glucanasa (1,4 (1,3;1,4- β -glucan-4-glucano hidrolas) en los fotobiontes sometidos a los distintos tratamientos tal como se indicó en el apartado 16.4 (Material y Métodos).

La Fig. 58 presenta los valores de actividad glucanasa estimados tanto para las células control como para los diferentes tratamientos. Tal como se puede apreciar cuando las células presentan el receptor de pared, las isoelectinas deben ser retenidas y, en este caso, la actividad glucanasa tomó valores similares a los obtenidos para células no tratadas o incubadas en urea durante 4h. Sin embargo, cuando las proteínas son susceptibles de incorporarse al contenido intracelular, favoreciendo la hidrólisis de arginina y el consiguiente incremento de putrescina, se observó un aumento de la actividad glucanasa, 6,24 veces superior en el caso de incubación con ABP y 5,0 veces en los fotobiontes tratados con SA con respecto al control.

Con objeto de obtener protoplastos, se utilizaron diferentes isotónicos tales como el manitol, sorbitol, etc a distintas concentraciones. Sin embargo, en estos casos no se observaron roturas de pared puesto que la glucanasa era inhibida por estos polialcoholes entre un 30-50%

3.7. Efecto de la putrescina y urea sobre la actividad glucanasa

Cuando las células se incubaron con ABP o SA tras haber sido incubadas previamente con arginina, se observó un aumento del contenido de putrescina libre en ambos casos (Fig.50) y de putrescina conjugada a macromoléculas en el caso del tratamiento con arginasa segregable (Fig. 51). Por otra parte, tal como muestran las Figs. 56 y 57 la incubación de los fotobiontes con estas isoelectinas con actividad arginasa provocó la rotura de pared, con la consiguiente formación de fantasmas y pérdida del contenido citoplasmático.

A continuación se analizaron las posibles relaciones entre el incremento en la concentración de putrescina y urea la activación de la glucanasa y la subsecuente hidrólisis de los polímeros de glucosa

que constituyen la pared del alga. Como se observa en la Fig. 59.A, cuando se analizó el efecto de concentraciones crecientes de putrescina sobre la actividad enzimática de una glucanasa comercial, se observó que dicha actividad desciende para bajas concentraciones de putrescina aumentando cuando se incrementó la concentración de esta diamina, si bien elevadas concentraciones (10 mM) provocaron una caída en la actividad específica. En todos los casos la actividad enzimática fue inferior al control que no presentaba efector en la mezcla de reacción.

Cuando se ensayó la actividad glucanasa en extractos libres de células incubados con diferentes concentraciones de putrescina, se observó que en el extracto control la actividad glucanasa estaba inhibida, puesto que no se detectaba. Cuando los extractos se incubaron con distintas concentraciones de la diamina durante 5 h y 30 min la actividad incrementó, tomando valores aproximados de 11 miliunidades (Fig. 59.B). Los valores de actividad glucanasa se estimaron por interpolación de los valores de absorbancia en una recta patrón de glucosa donde se representaba la absorbancia en relación con la masa. Las distintas concentraciones de urea no incrementaron la actividad ureasa.

Fig. 33. Diagrama de desorción de lectina intratalina (ABP) con actividad arginasa en gel de fosfato cálcico (hidroxiapatita). (\circ) Concentración de proteínas, (\square) actividad arginasa.

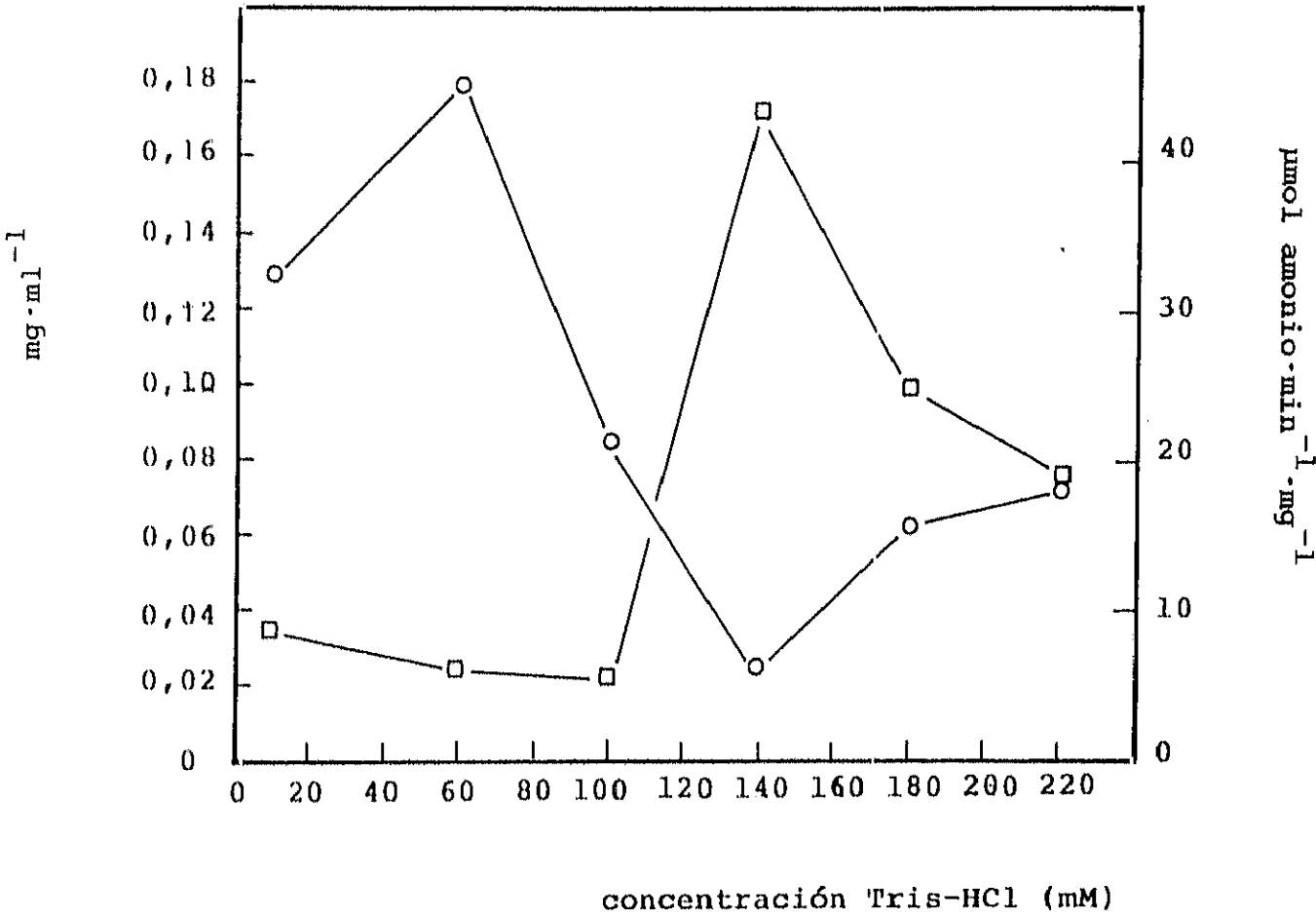


Fig. 34. Filtración a través de Sephadex G-150 de la fracción proteica de ABP desorbida de hidroxiapatita con tampón Tris-HCl 140 mM. Concentración de proteínas (○). Actividad arginasa (■).

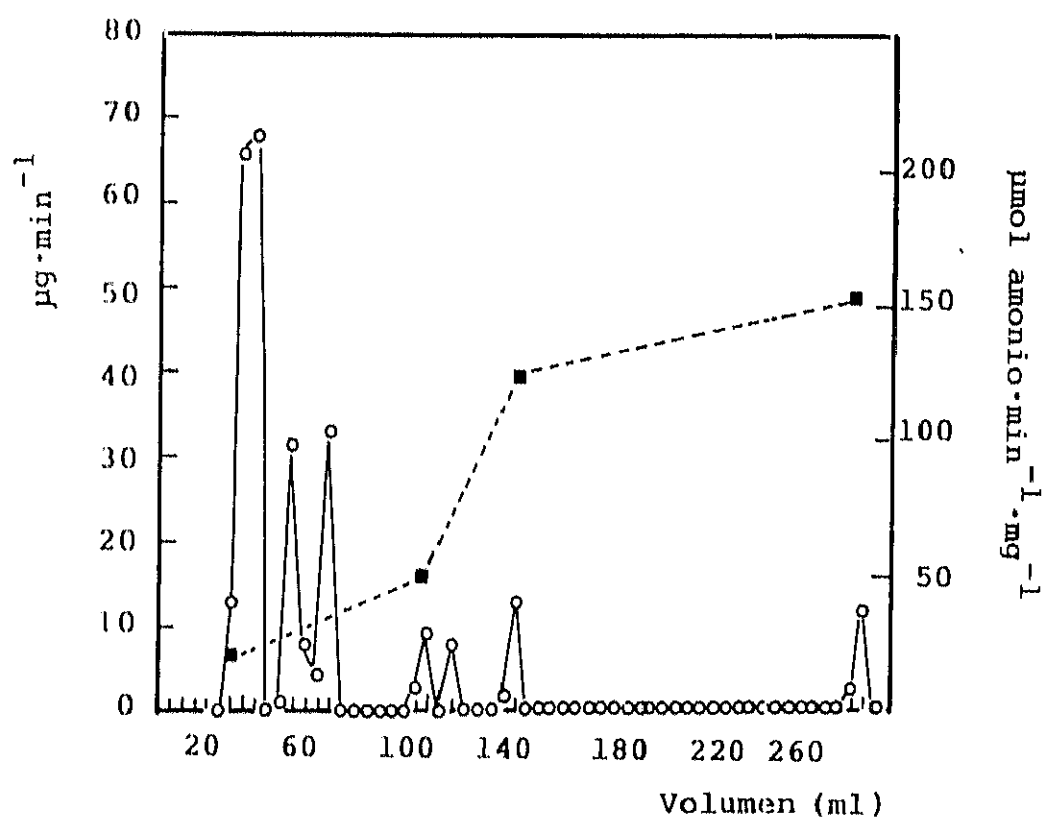


Fig. 35. Actividad arginasa segregada (SA) al medio de incubación con arginina 40 mM en función del tiempo en luz (A) o en oscuridad (B).

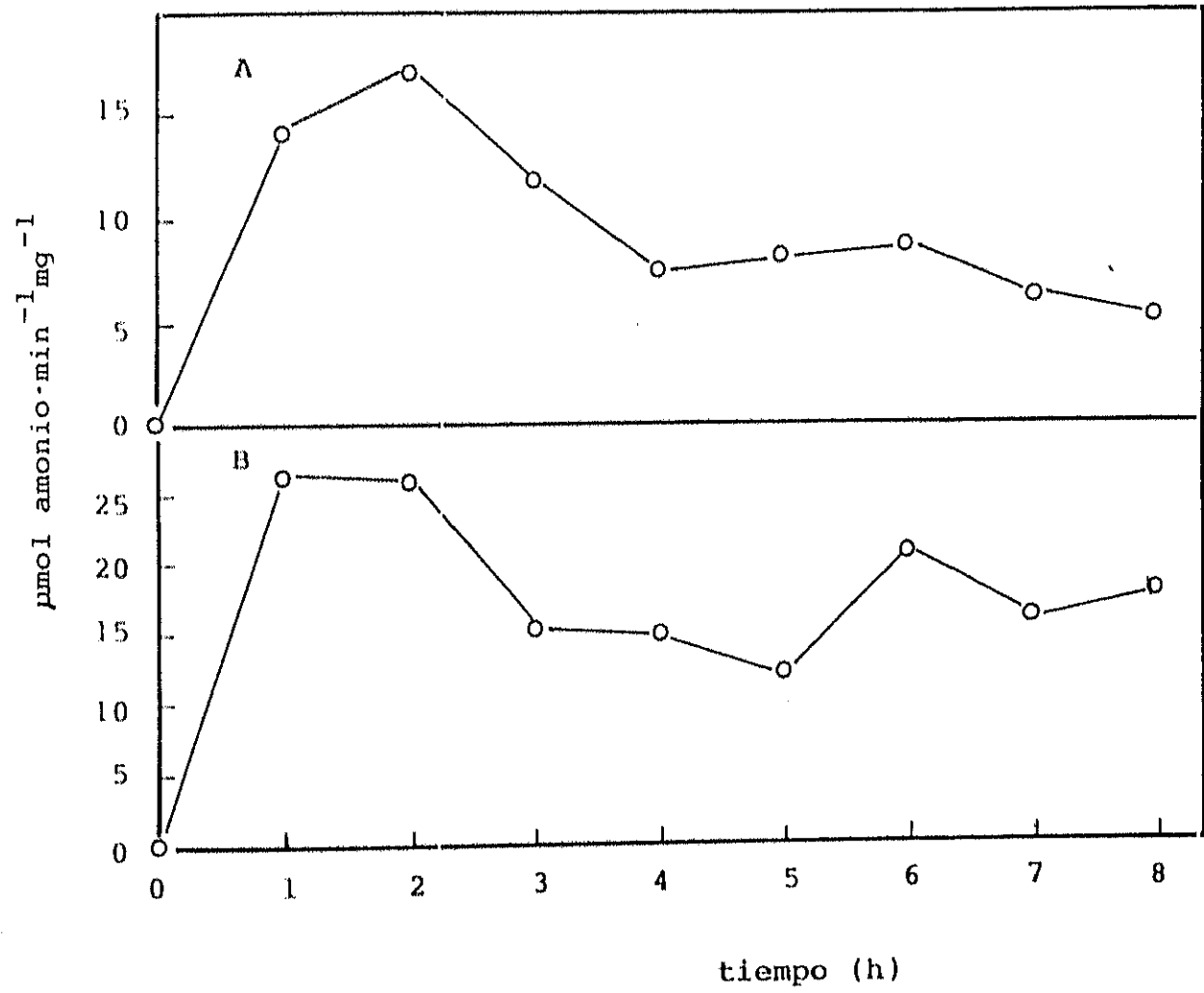


Fig. 36. Diagrama de desorción de arginasa segregable (SA) en gel de fosfato cálcico (hidróxiapatita).

(○) Concentración de proteínas. (□) actividad arginasa.

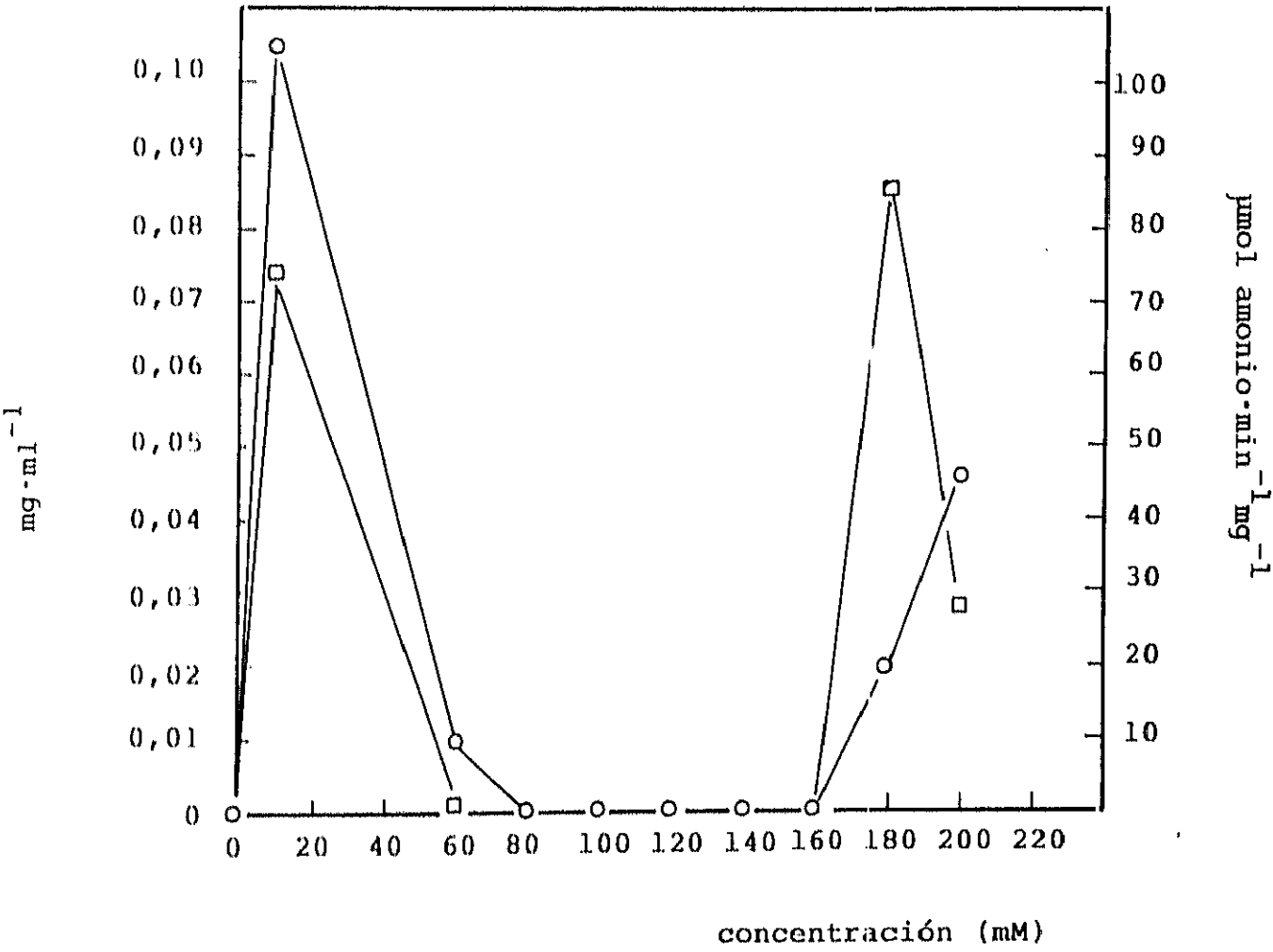


Fig. 37. Filtración a través de Sephadex G-150 de la fracción proteica de SA desorbida de hidroxiapatita con tampón Tris-HCl 180 mM. Concentración de proteínas (○). Actividad arginasa (■).

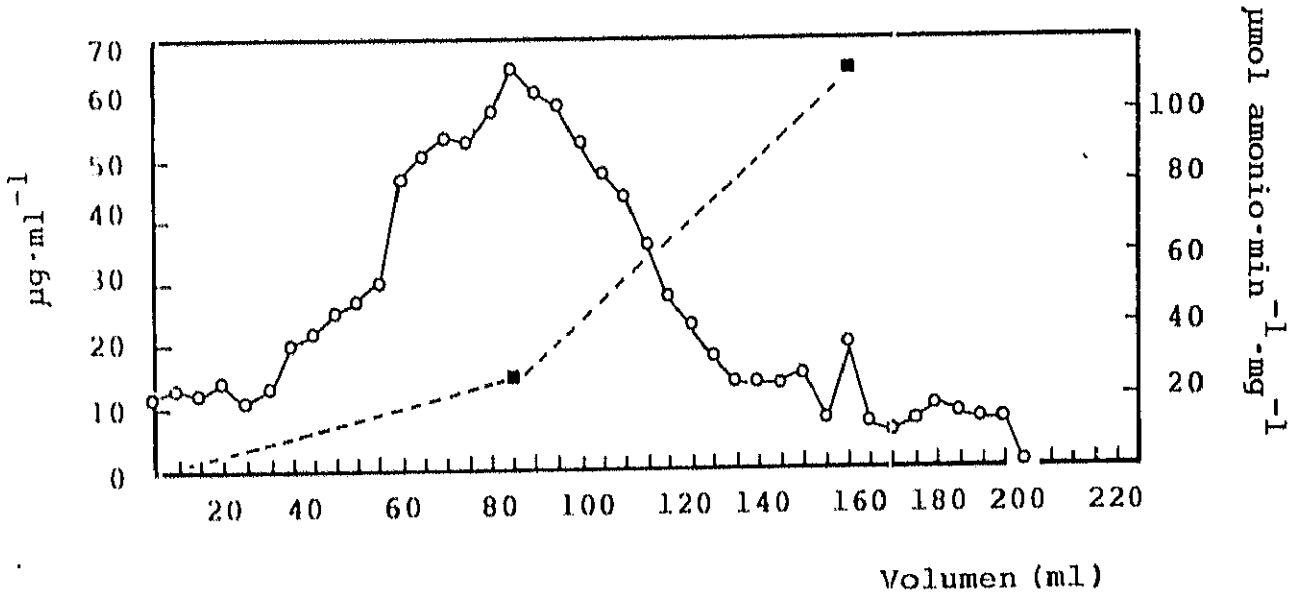


Fig. 38. Estimación del punto isoelectrico. (A) Electroferograma de ABP, (B) electroferograma de SA, en ambos casos indicando el tiempo de migración en min. (C) Recta patrón de calibrado para la determinación del punto isoelectrico en función de la movilidad electroforética (m_e), construida con proteínas de pI conocido; $y = -3,5 + 0,75x$, $r^2=0,99$. 1=tioglobulina, pI 4,5; 2=alcohol deshidrogenasa, pI 5,4; 3=anhidrasa carbónica, pI 5,9; 4=mioglobina, pI 7,0; 5=benzol, pI 9,0, según Pedrosa (1993). La flecha llena indica el pI de ABP y SA.

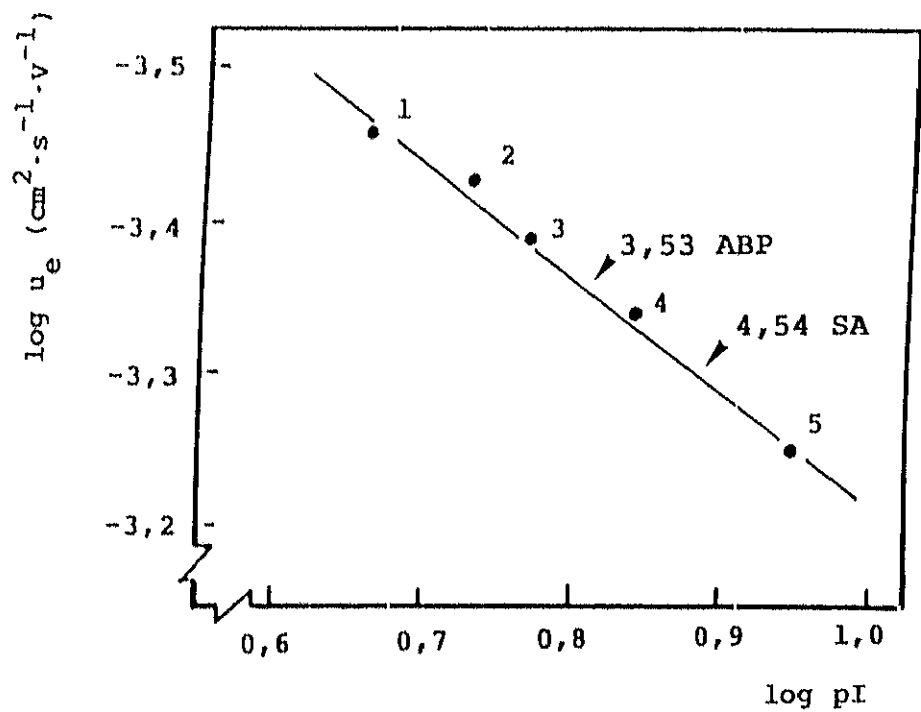
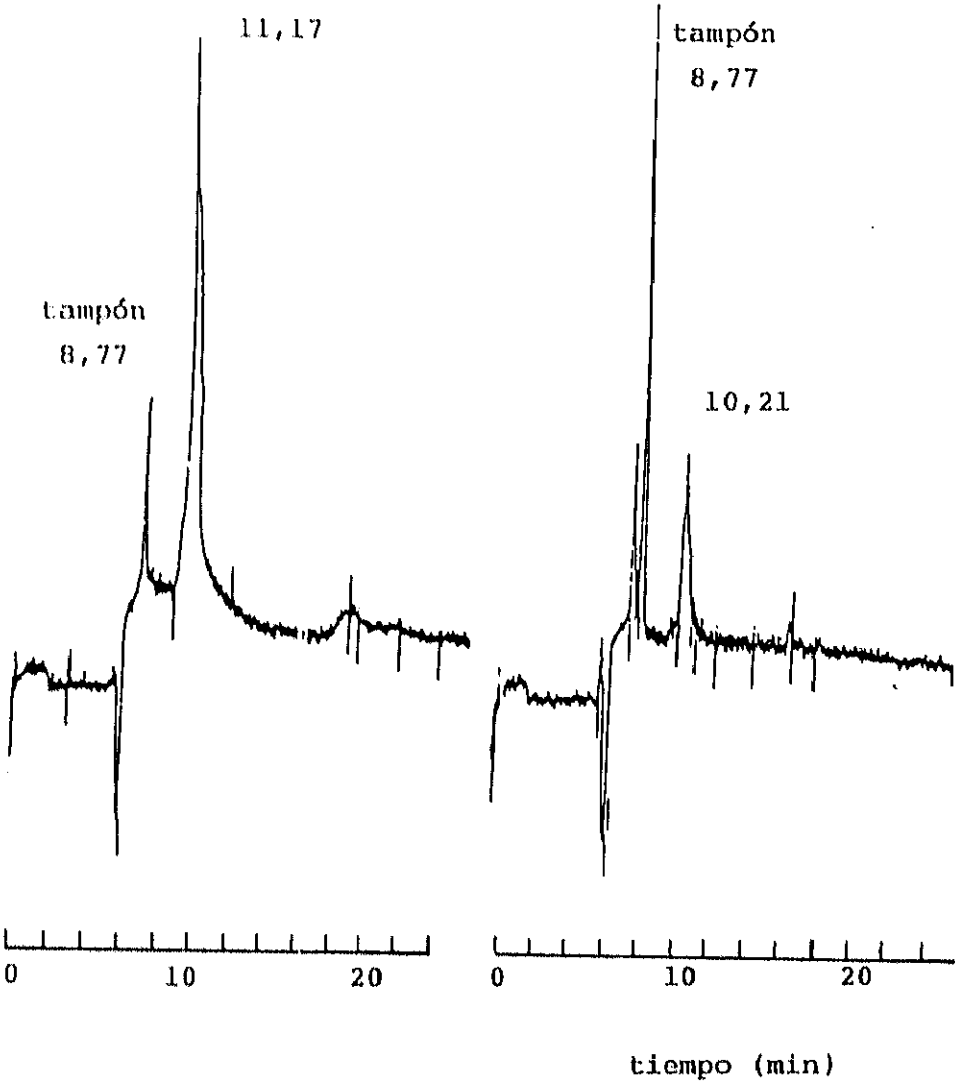


Fig. 39. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con SDS al 0,1%. (A) ABP, (B) SA, (C) mezcla patrón de proteínas de peso molecular conocido: carbónico anhidrasa, 29 kDa; ovoalbumina, 45 kDa y seroalbumina, 66 kDa.

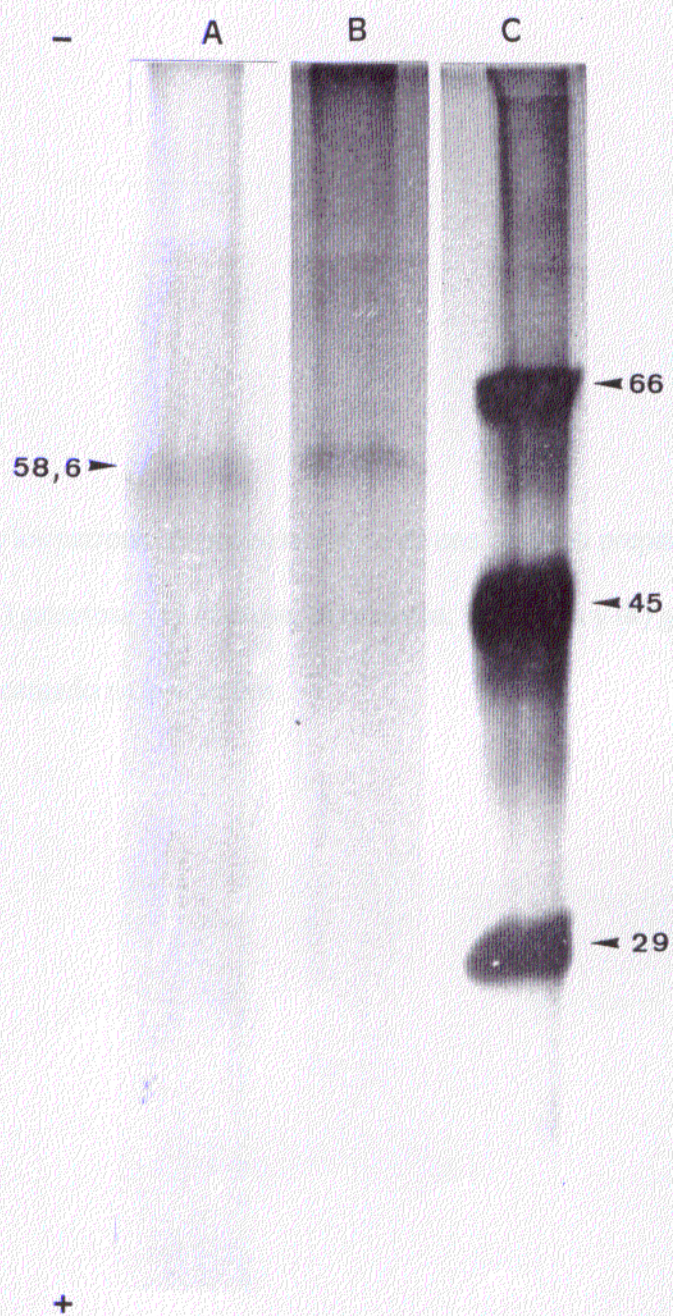


Fig. 40. Elución de los patrones de monosacáridos de una columna preparativa de alumina donde (●) es glucosa, (▲) galactosa, (○) fructosa, (△) manosa, (◆) fucosa y (■) glucosamina. 40 mg de cada patrón fue cargado en la columna.

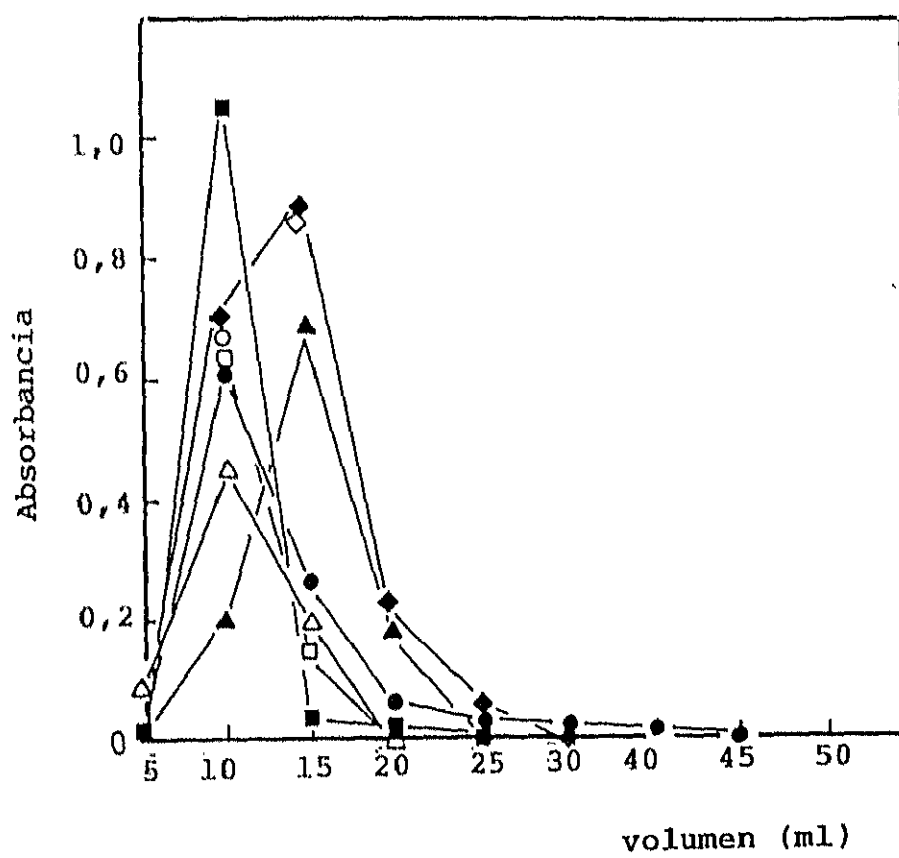


Fig. 41. Elución de galactosa por HPLC en fase reversa antes (**A**) y después (**B**) de la filtración a través de la columna de alumina. El número de los picos indica el tiempo de retención.

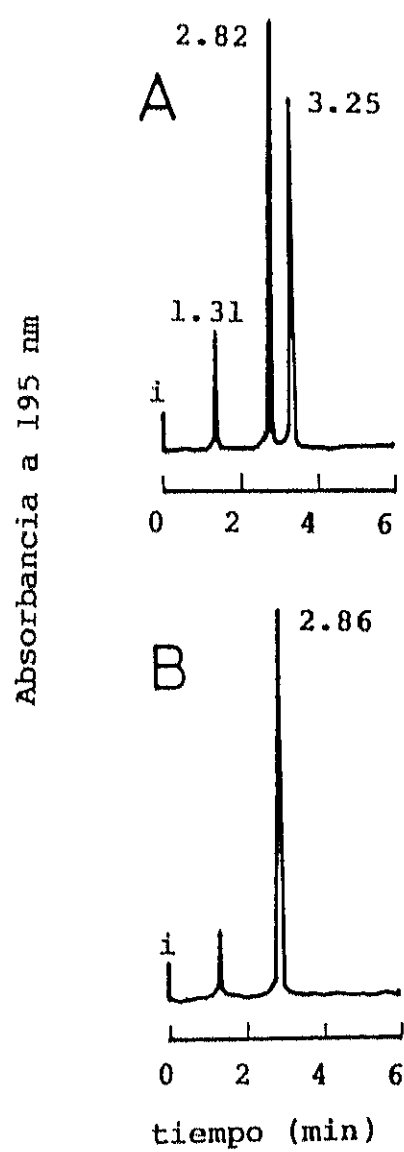


Fig. 42. Elución de glucosa por HPLC en fase reversa antes (A) y después (B) de la filtración a través de la columna de alumina. El número de picos indica el tiempo de retención.

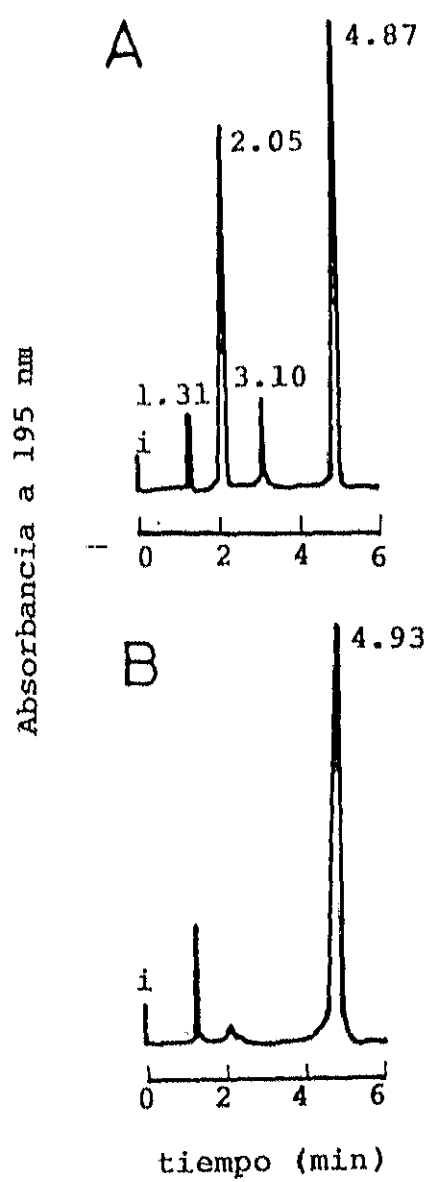


Fig. 43. Elución de la fracción etanol soluble tras la hidrólisis de ABP (**A**), la misma muestra pero cebada con N-acetyl-D-glucosamina (**B**) y cargada con glucosa (**C**).

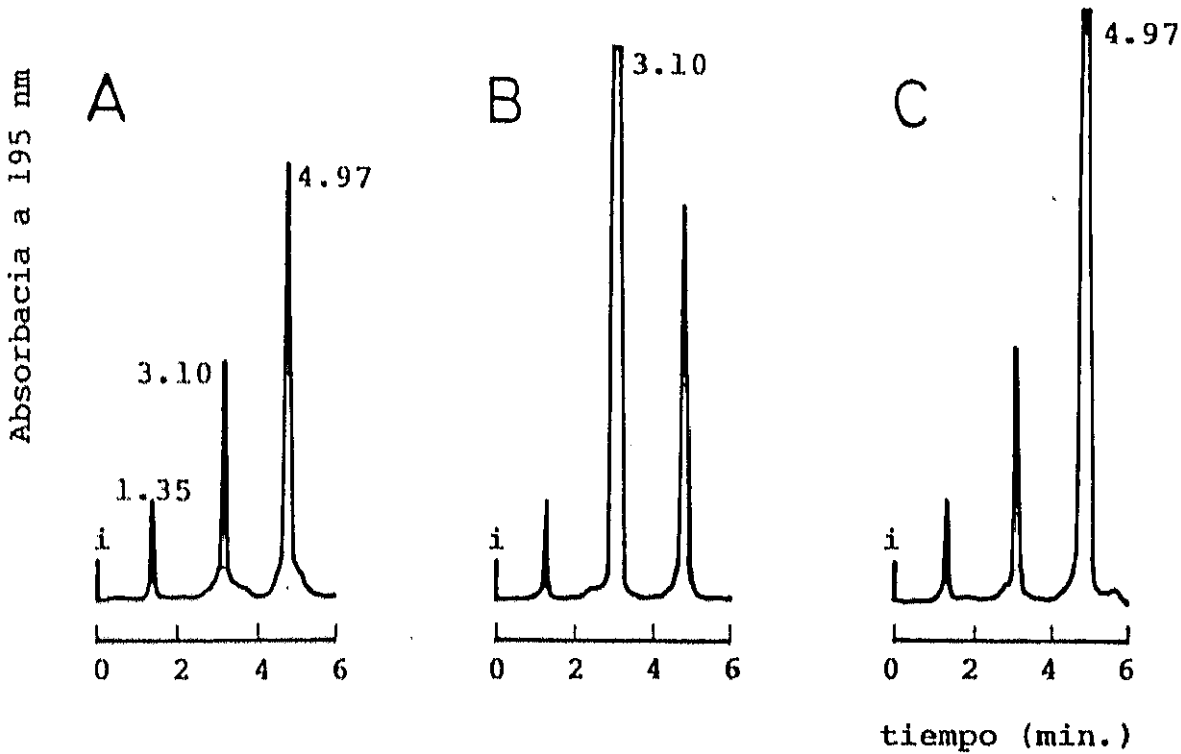


Fig. 44. Elución de la fracción etanol-soluble tras la hidrólisis de SA (A), la misma muestra pero cebada con glucosa (B), con N-acetil-D-glucosamina (C), con galactosa (D) y (E) mezcla equimolar de patrones galactosa y N-acetil-D-glucosamina.

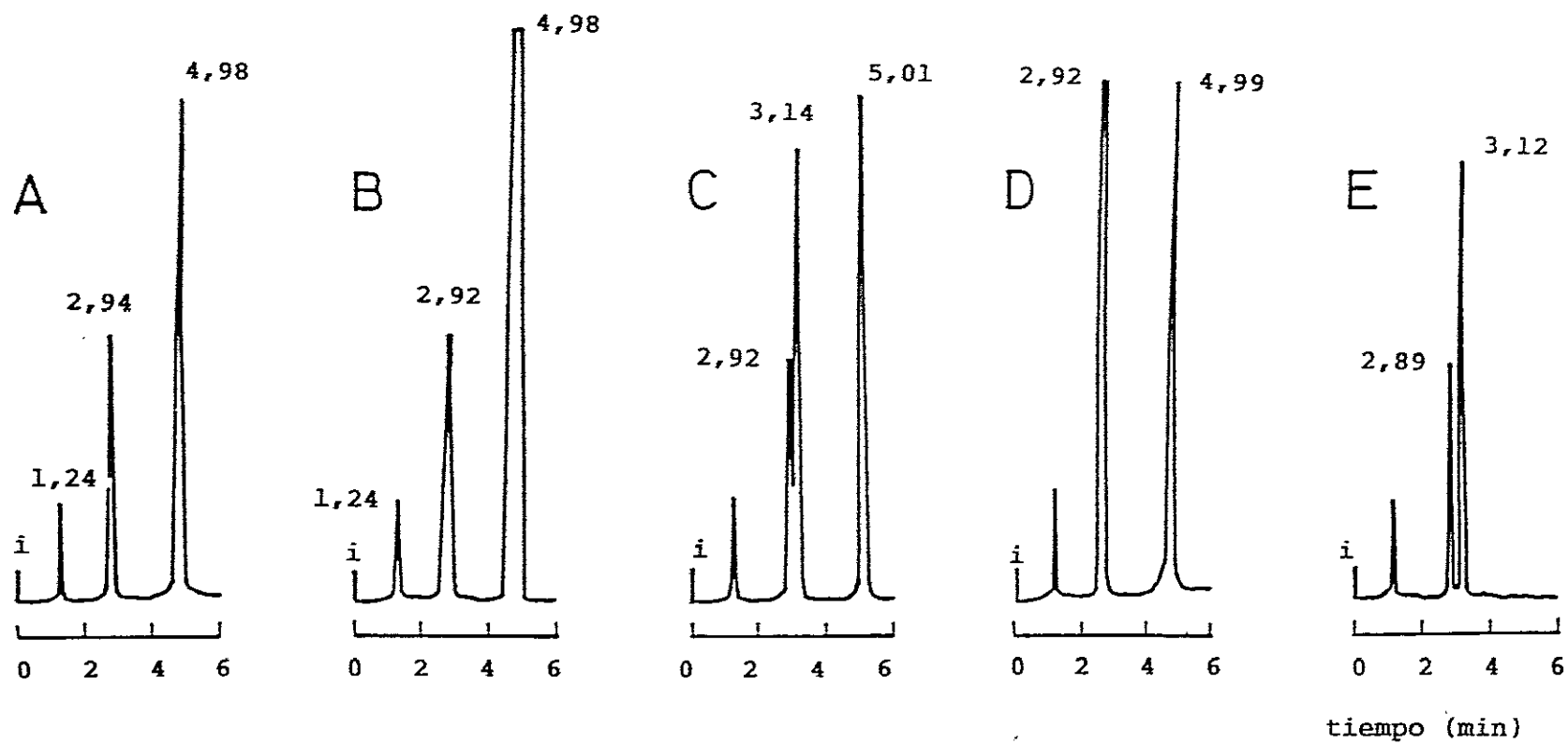


Fig. 45. Rectas de calibración lineal de azúcares por HPLC. Calibración directa de galactosa, $y = 246351x + 24796$, $r^2 = 0,97$ (●); glucosa $y = 89367x + 32987$, $r^2 = 0,96$ (■) y N-acetilglucosamina, $y = 9253970x + 343023$, $r^2 = 0,99$ (▲) y calibración indirecta con respecto al patrón interno (2,0 mg×ml⁻¹ ribitol) de galactosa, $y = 124297x - 11322$, $r^2 = 0,99$ (○); glucosa, $y = 55466x + 7654$, $r^2 = 0,99$ (◻) y N-acetilglucosamina, $y = 9253967x - 70878$, $r^2 = 0,99$ (△). El dato es la media de tres replicas. El error estándar nunca fue mayor que los símbolos.

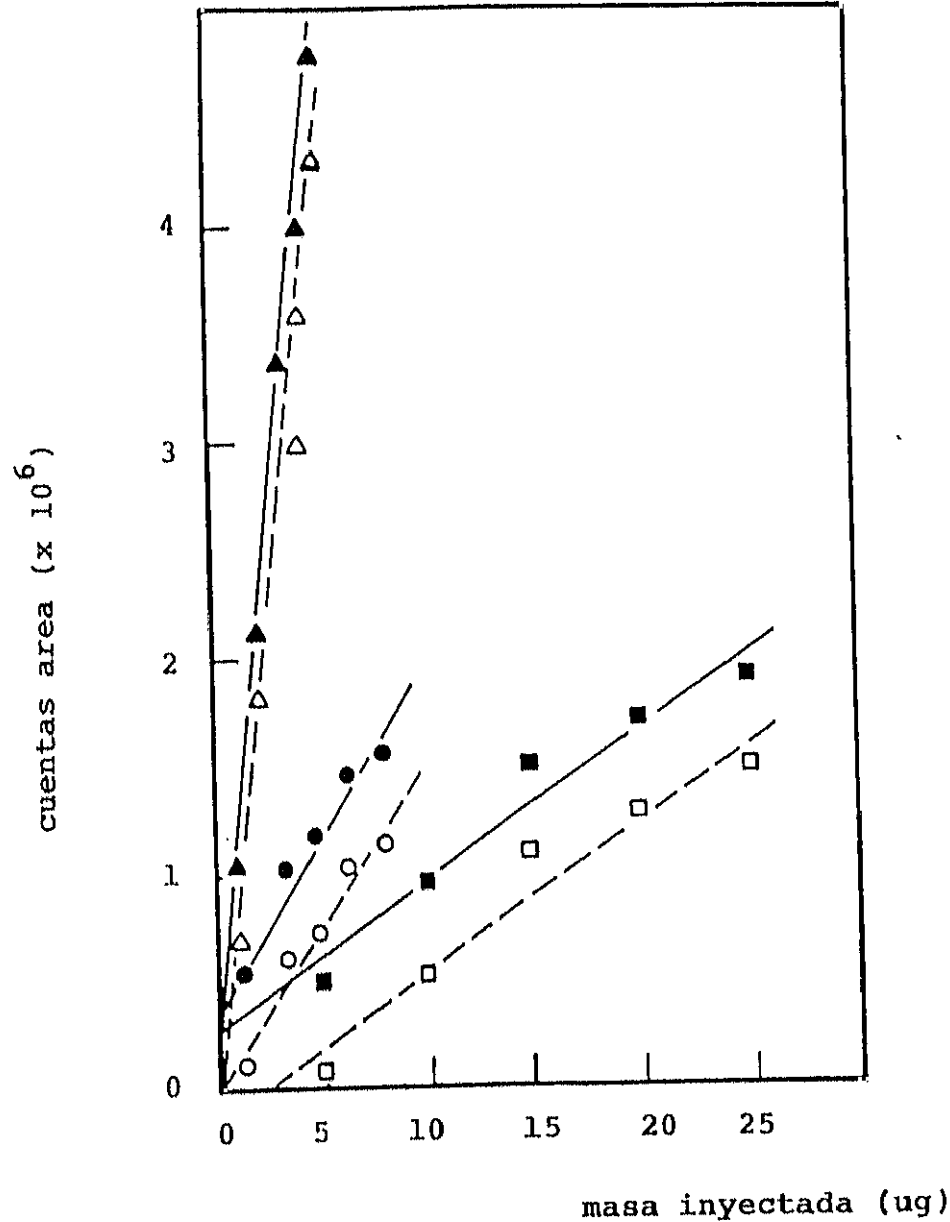


Fig. 46. Espectro de emisión de fluorescencia de $33,6 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ de ABP (A) y de $71 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ de SA (B) disueltos en agua destilada. Longitud de onda de excitación 257 nm.

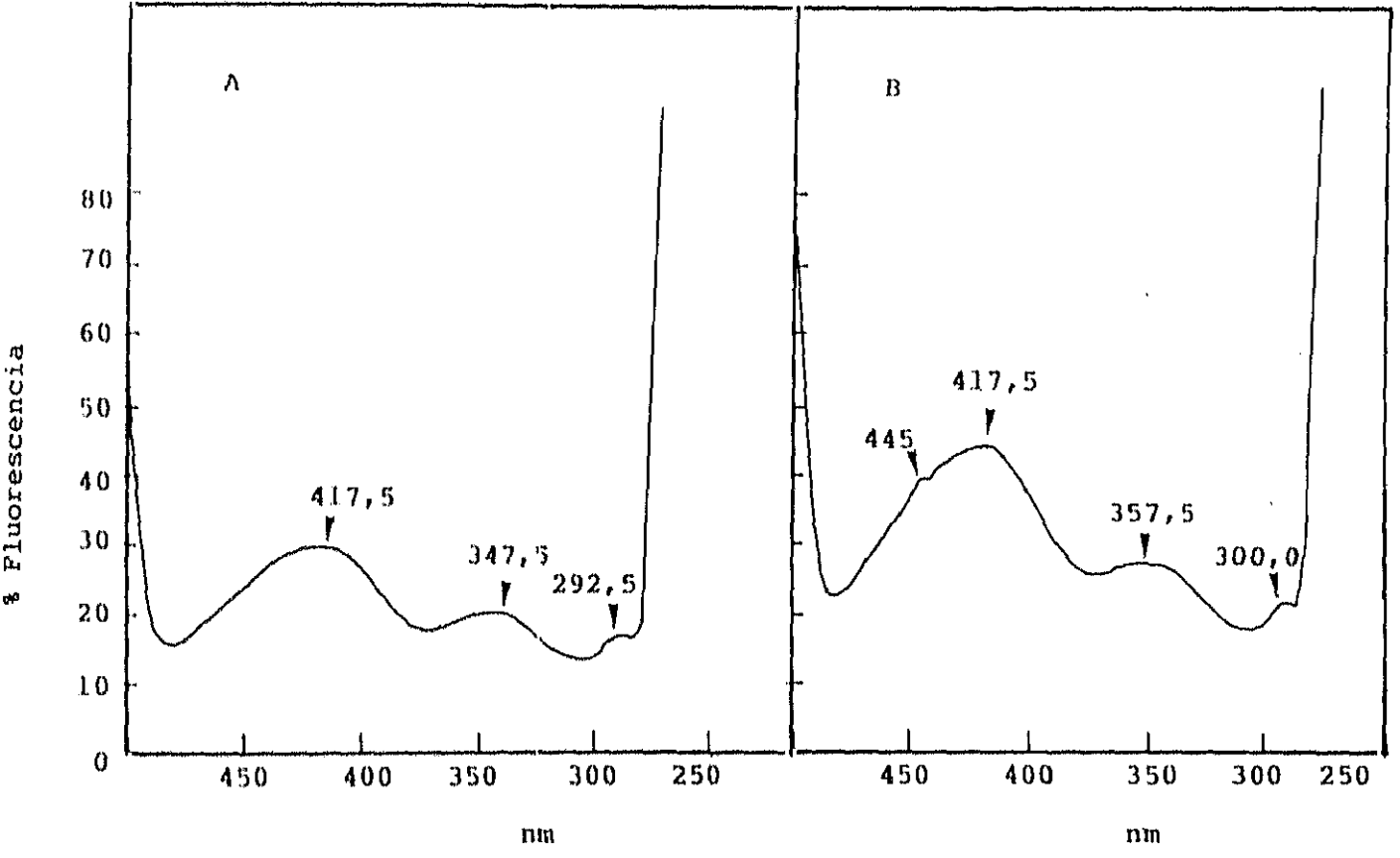


Fig. 47. (A) Espectro de absorbancia de la fluoresceína en acetona:tampón PBS, pH 7,4 (1:1, v/v). **(B)** Espectro de emisión de fluorescencia utilizando como longitud de onda de excitación el máximo de absorbancia.

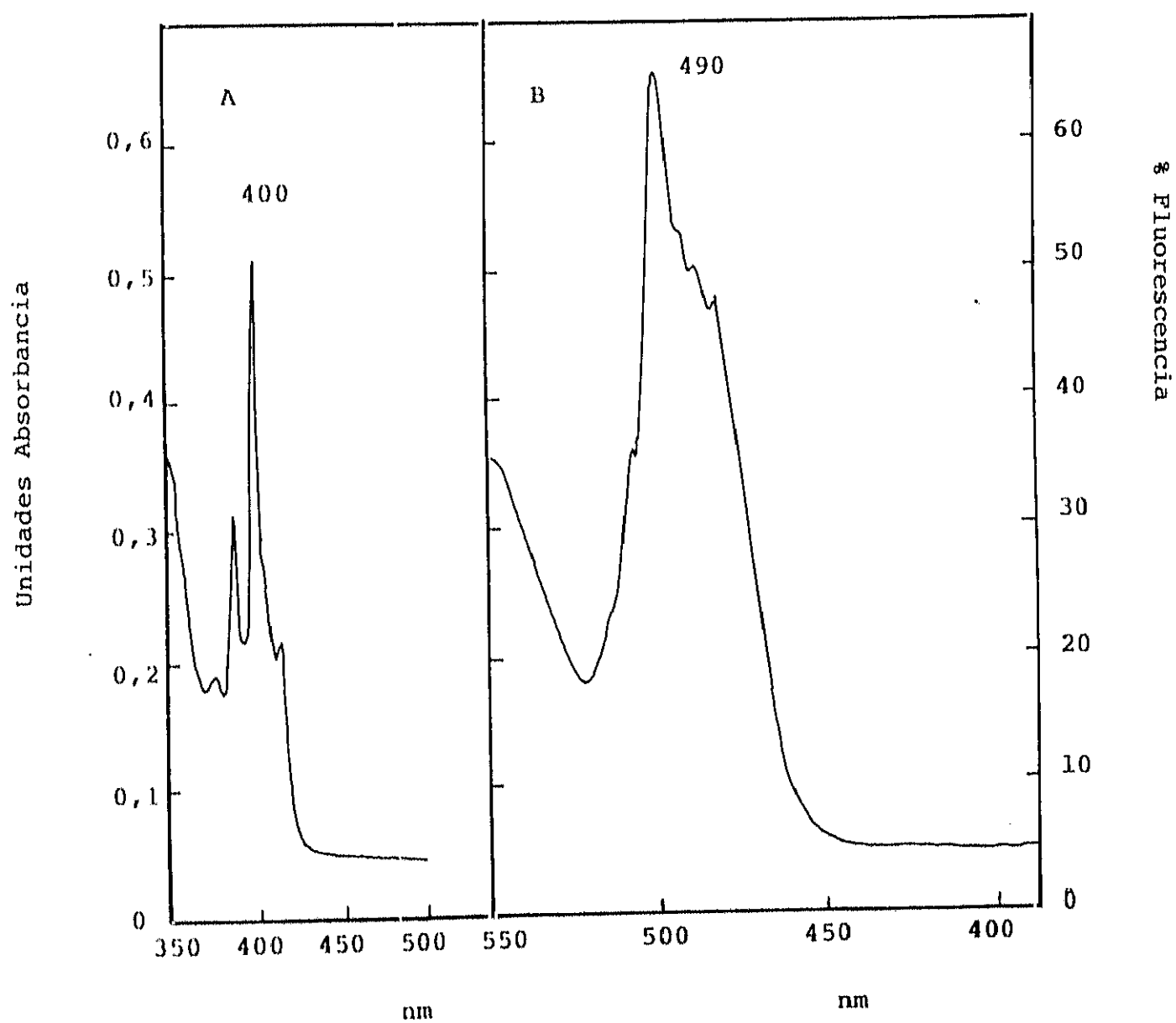


Fig. 48. Microscopía de fluorescencia. Fotobiontes recién aislados e incubados en urea 100 mM durante 4h y posteriormente incubados con lectina intratalina purificada (ABP) durante 30 min.

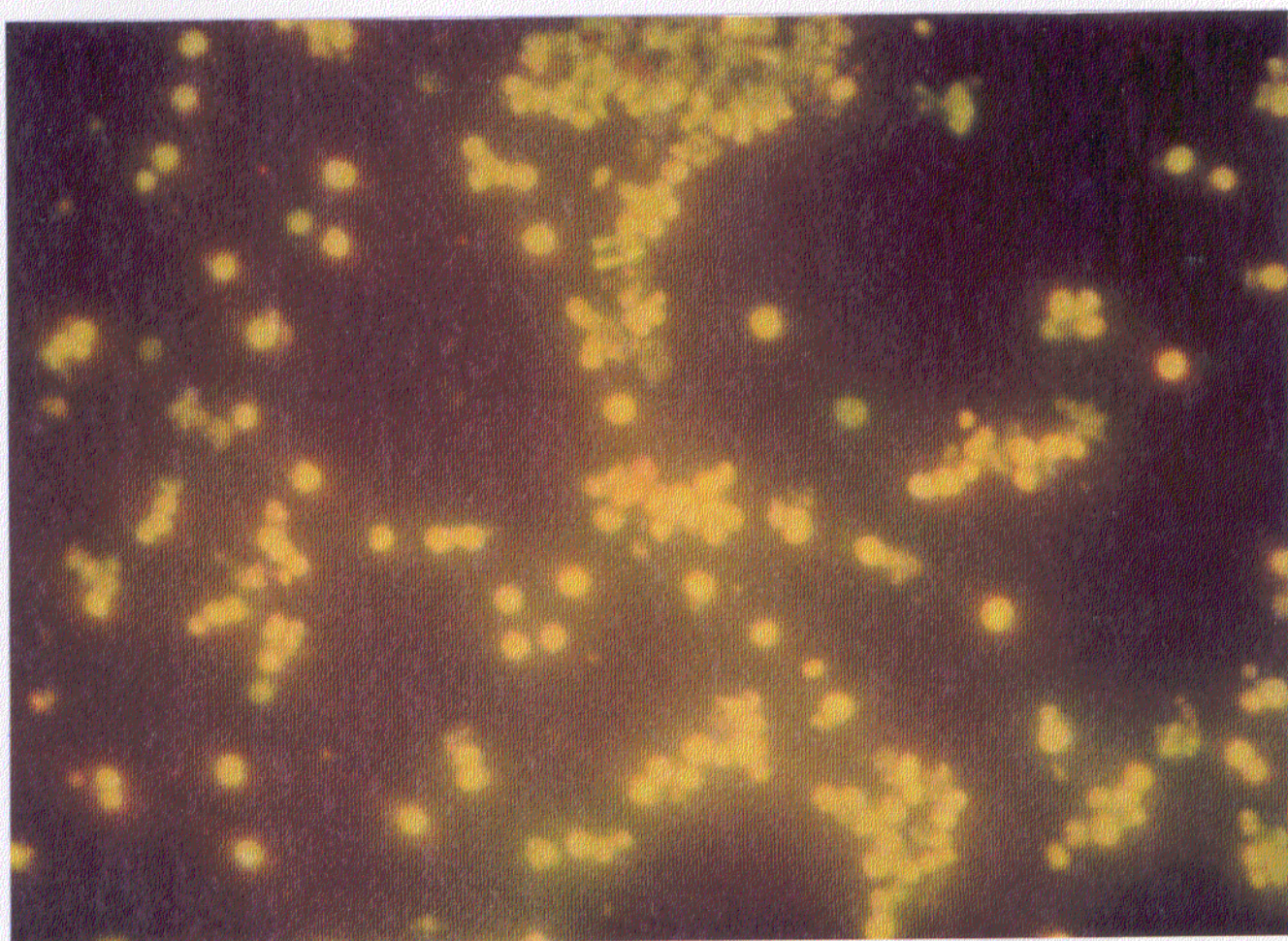


Fig. 49. Rectas de calibración lineal de poliaminas por HPLC. Calibración indirecta de putrescina $y = 0,00258x - 0,0058$ $r^2 = 0,95$ (o); espermidina $y = 0,00095x - 0,00139$ $r^2 = 0,96$ (□) y espermina $y = 0,0004x + 0,0011$ $r^2 = 0,98$. El dato es la media de tres réplicas. El error estándar nunca fue mayor que los símbolos.

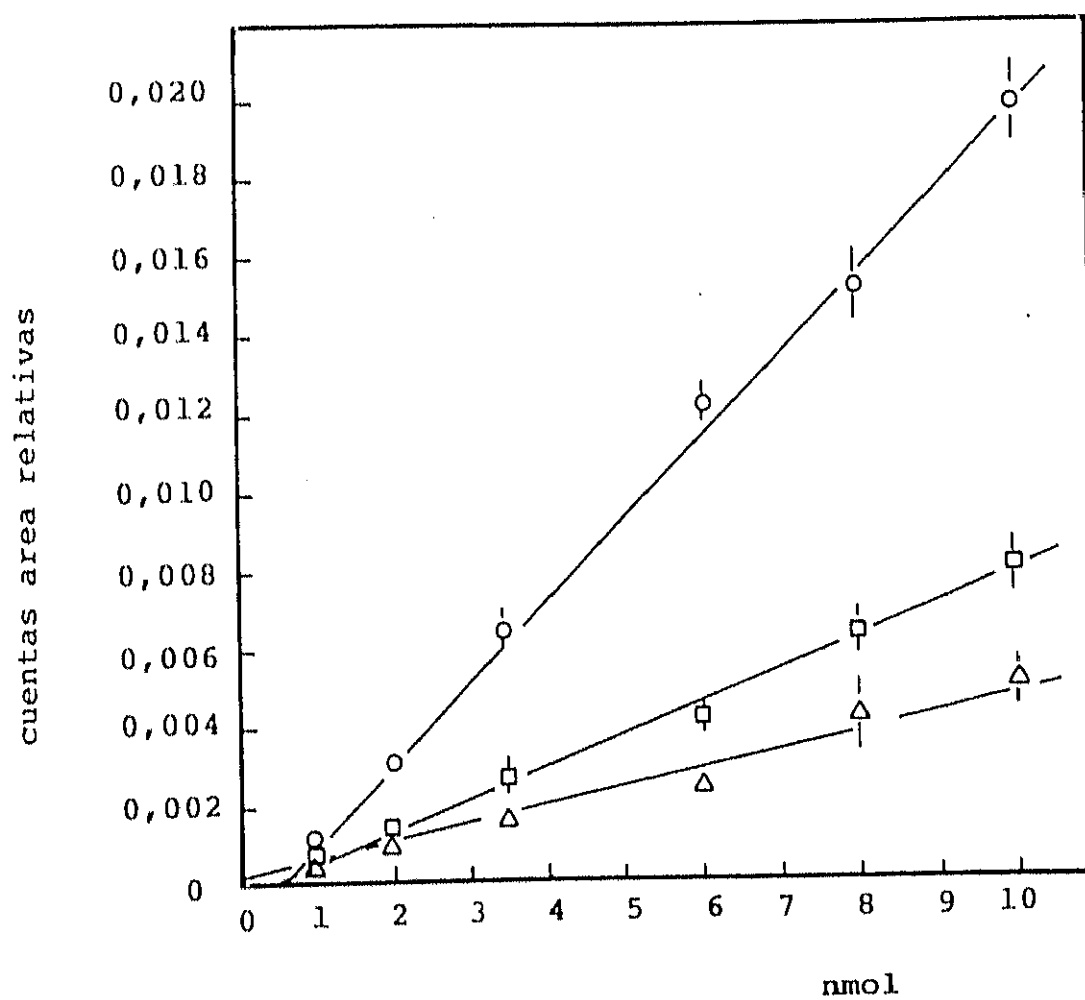


Fig. 50. Cuantificación de poliaminas libres (Fraccion S) en fotobiontes de *X. parietina* cultivados a 26°C en 1: tampón PBS durante 3h; 2: ABP durante 3h; 3: SA durante 3h; 4: arginina 28 mM durante 30 min y PBS durante 3h; 5: arginina 28 mM durante 30 min y ABP durante 3h; 6: arginina 28 mM durante 30 min y SA durante 3h; 7: urea 100 mM durante 4h y PBS durante 3h; 8: urea 100 mM durante 4h y ABP durante 3h; 9: urea 100 mm durante 4h y SA durante 3h; 10: arginina 28 mM durante 30 min, urea 100 mM durante 4h y PBS durante 3h; 11: arginina 28 mM durante 30 min, urea 100 mM durante 4h y ABP durante 3h; 12: arginina 28 mM durante 30 min, urea 100 mM durante 4h y SA durante. El valor dado es la media de tres replicas. El error estándar nunca fue superior al 8%. (⊞) putrescina, (↗) espermidina, (⊞) espermina.

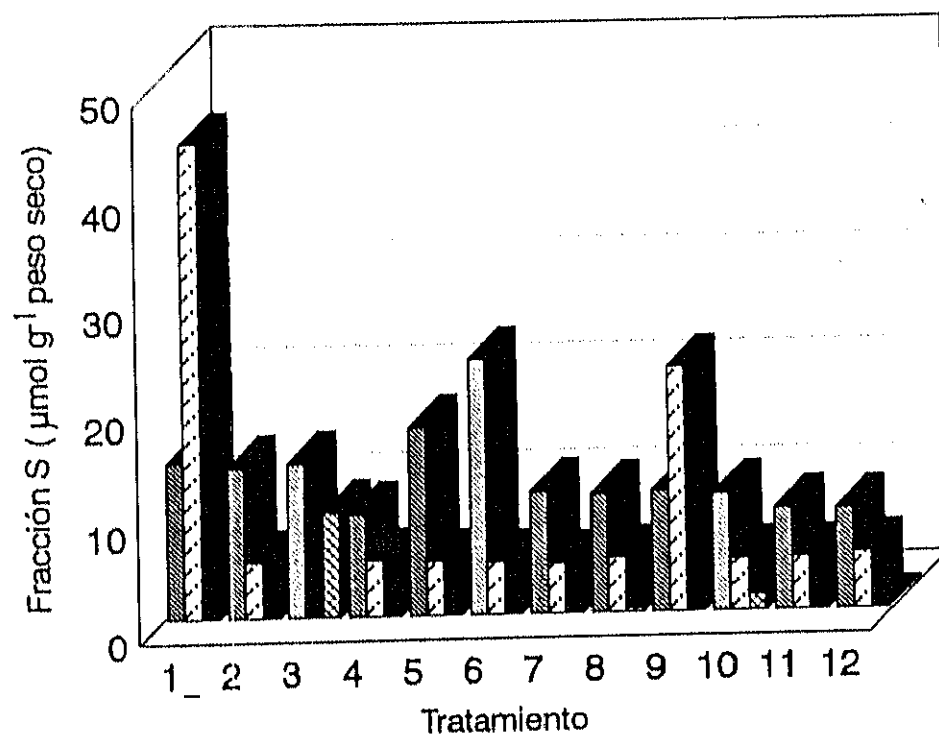


Fig. 51. Cuantificación de poliaminas conjugadas a macromoléculas insolubles en agua (Fracción PH) en fotobiontes de *X. parietina* tratados como en la Fig. 50.

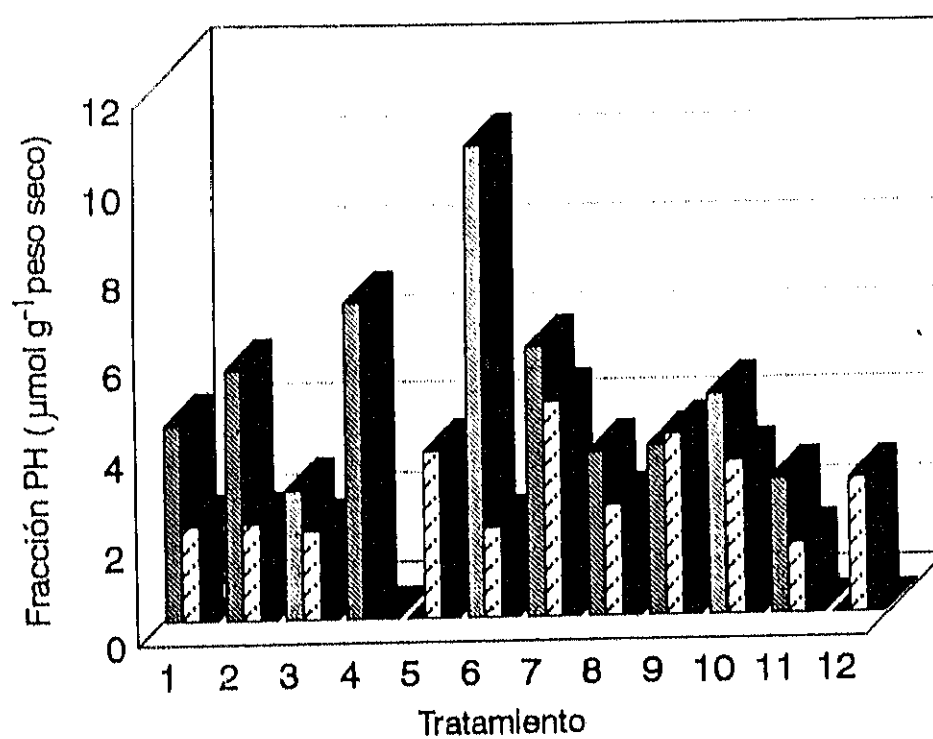


Fig. 52. Cuantificación de poliaminas conjugadas a macromoléculas solubles en agua (Fracción SH) en fotobiontes de *X. parietina* tratados como en la Fig. 50.

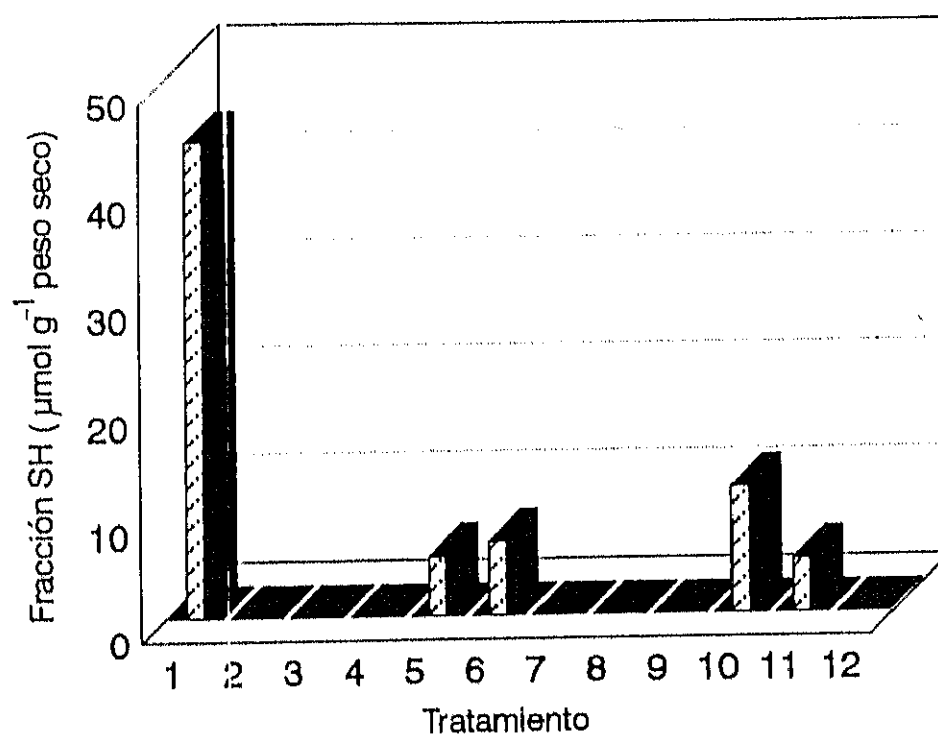


Fig. 53. Cromatograma de clorofilas endógenas de fotobiontes de *X. parietina* no tratados (A) e incubados con putrescina en tampón fosfato pH 7,0 durante 3 h a 26°C (B).

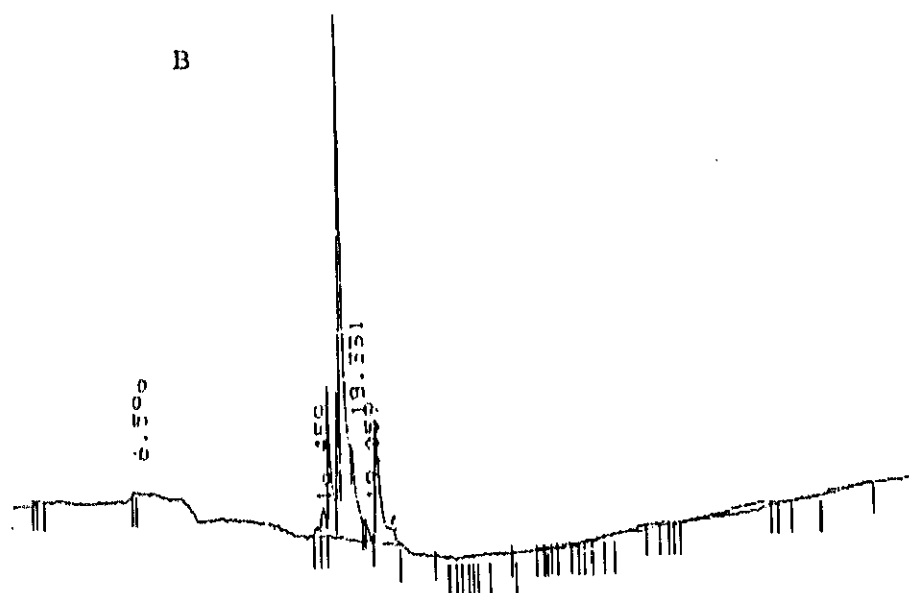
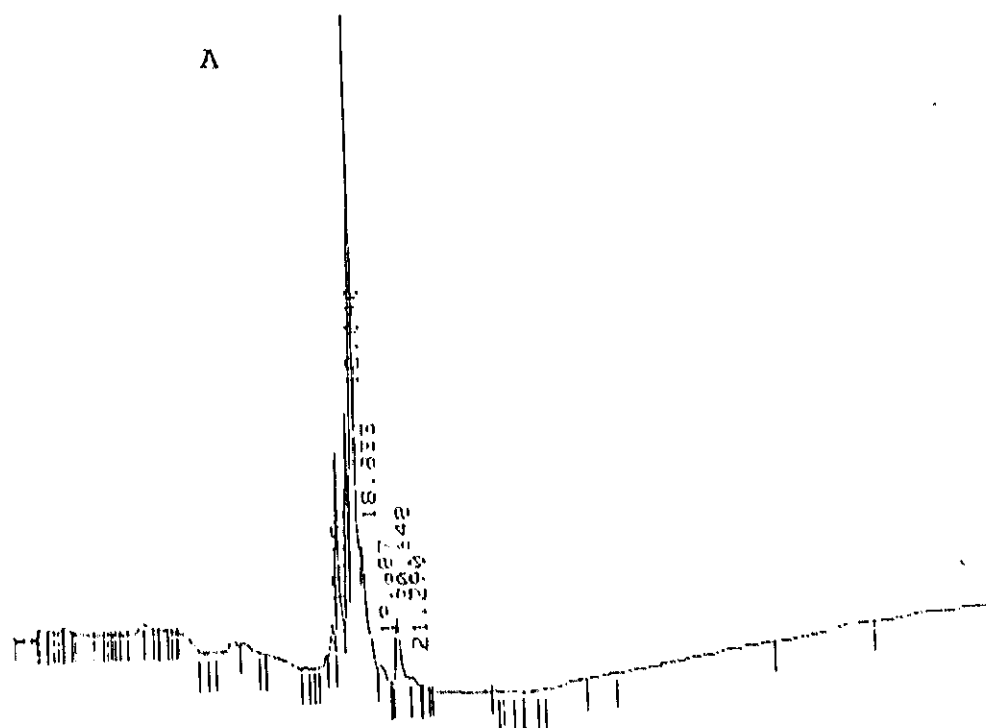


Fig. 54. Microscopía óptica de actividad eritroaglutinante de ABP en el momento de incorporar la proteína (A), después de 5 min (B) y tras 15 min de incubación (C) así como de SA a tiempo cero (D), después de 5 min (E) y tras 15 min de observación (F). La barra indica 10 μ m.

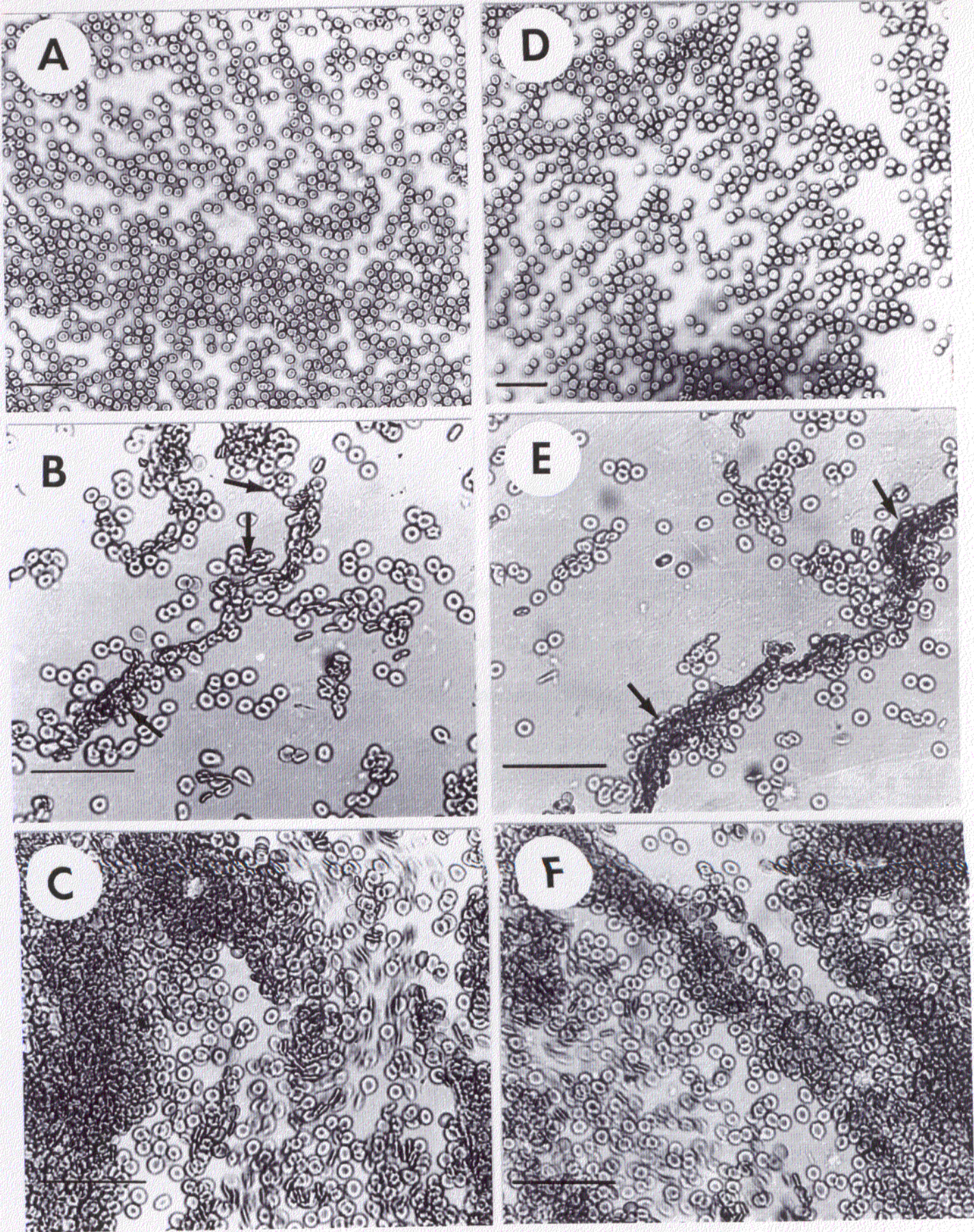


Fig. 55. Actividad ureasa en paredes de los fotobiontes aislados de *X. parietina* tras los siguientes tratamientos: fotobiontes incubados en urea 100 mM durante 4h y después durante 3h en tampón(1) o en ABP (2) o en SA (3); fotobiontes incubados durante 4h en tampón y posterior incubación en tampón (4) o ABP (5) o SA (6) durante 3h.

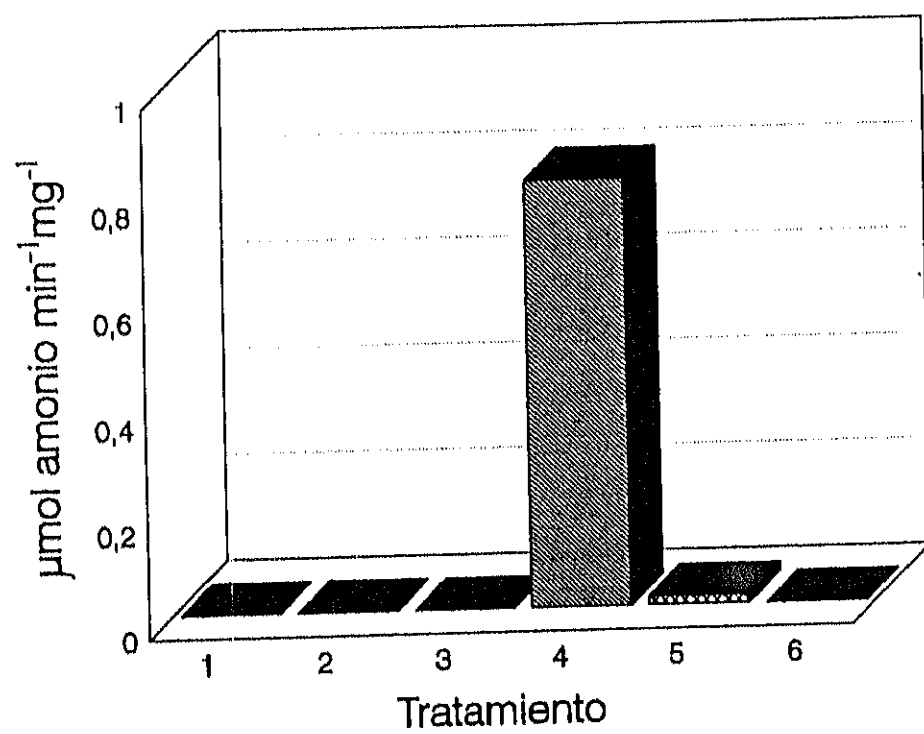
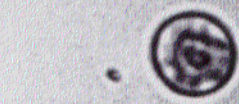


Fig. 56. Microscopia óptica de los fotobiontes de *X. parietina* incubados según los tratamientos siguientes. (A) Algas aisladas e incubadas en tampón durante 7 horas como control; (B) Algas aisladas e incubadas en urea durante 4h y posteriormente mantenidas en tampón durante 3h; (C) Algas inducidas en urea e incubadas a continuación en ABP durante 3h ; Algas no inducidas e incubadas en ABP durante 3h (D, E y F). La flecha señala los puntos de rotura y pérdida del contenido citoplásmico. La barra indica 10 μ m.

A



D



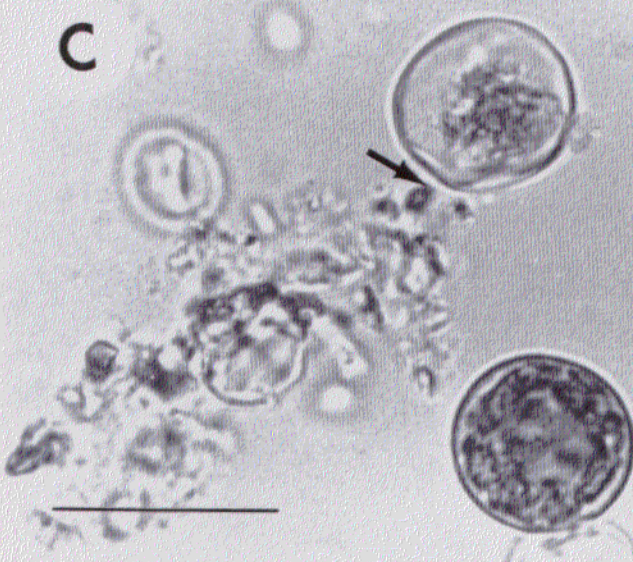
B



E



C



F

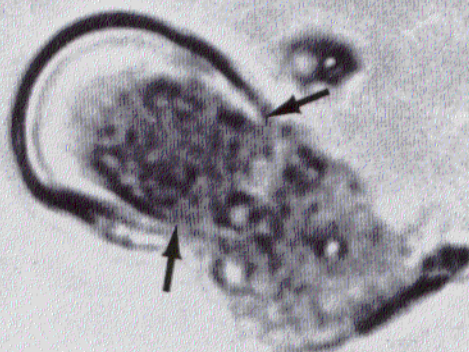


Fig. 57. Microscopía óptica de los fotobiontes de *X. parietina* incubados según los tratamientos: (A) urea durante 4h y posteriormente mantenidas en tampón durante 3h; (C) Algas inducidas en urea e incubadas a continuación en SA durante 3h; Algas no inducidas e incubadas en SA durante 3h (D, E y F). La flecha indica rotura de pared y pérdida del contenido citoplásmico. La barra señala los puntos de rotura. La barra indica 10 μm .

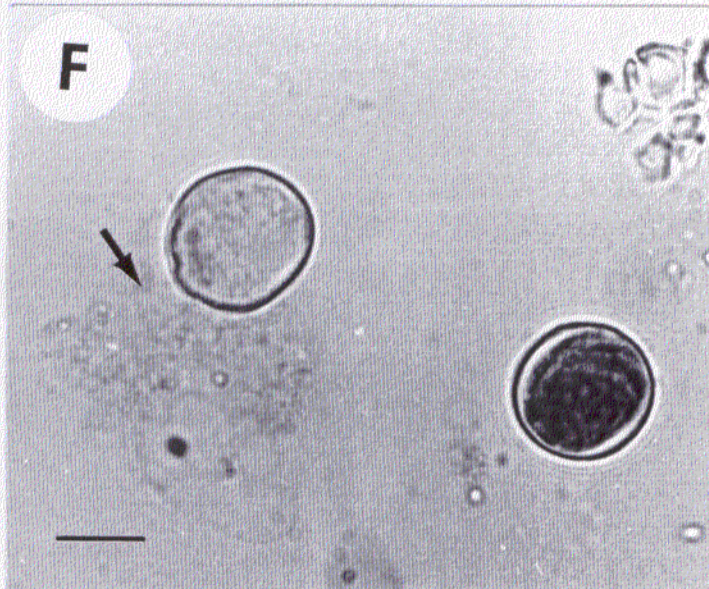
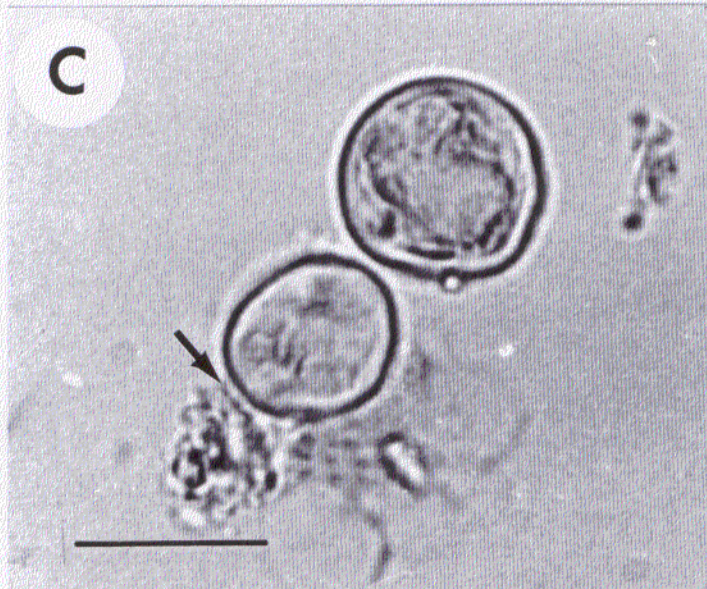
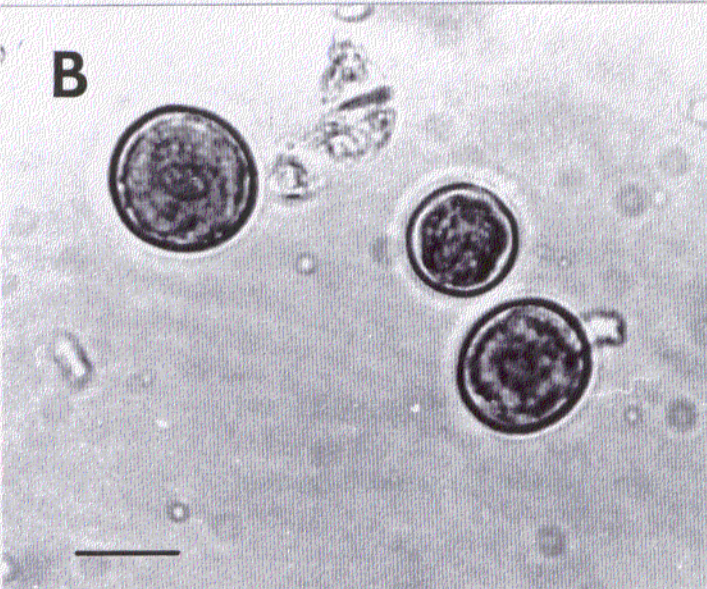
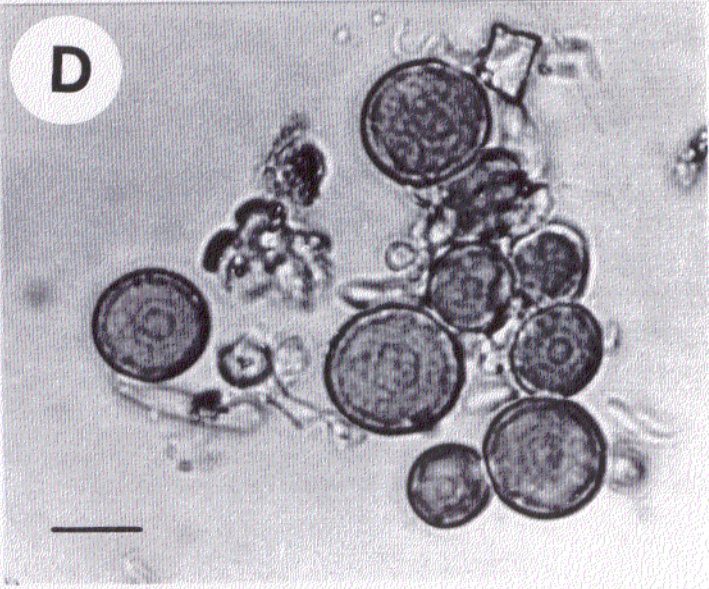
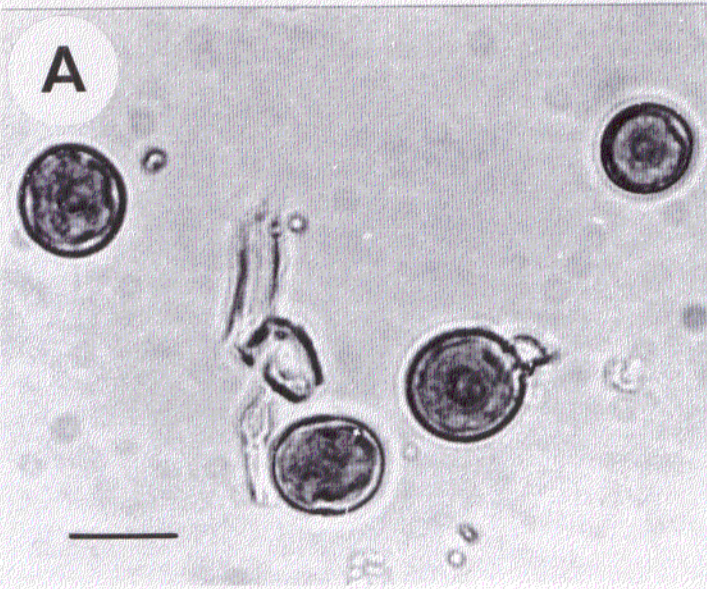


Fig. 58. Actividad glucanasa intracelular en fotobiontes aislados de *X. parietina* después de los siguientes tratamientos: fotobiontes incubados en tampón durante 4h y posteriormente mantenidos en tampón (1) o en ABP (2) o en SA (3) durante 3h; fotobiontes incubados en urea durante 4h y posteriormente mantenidos en tampón (4) o en ABP (5) o en SA (6) durante 3h.

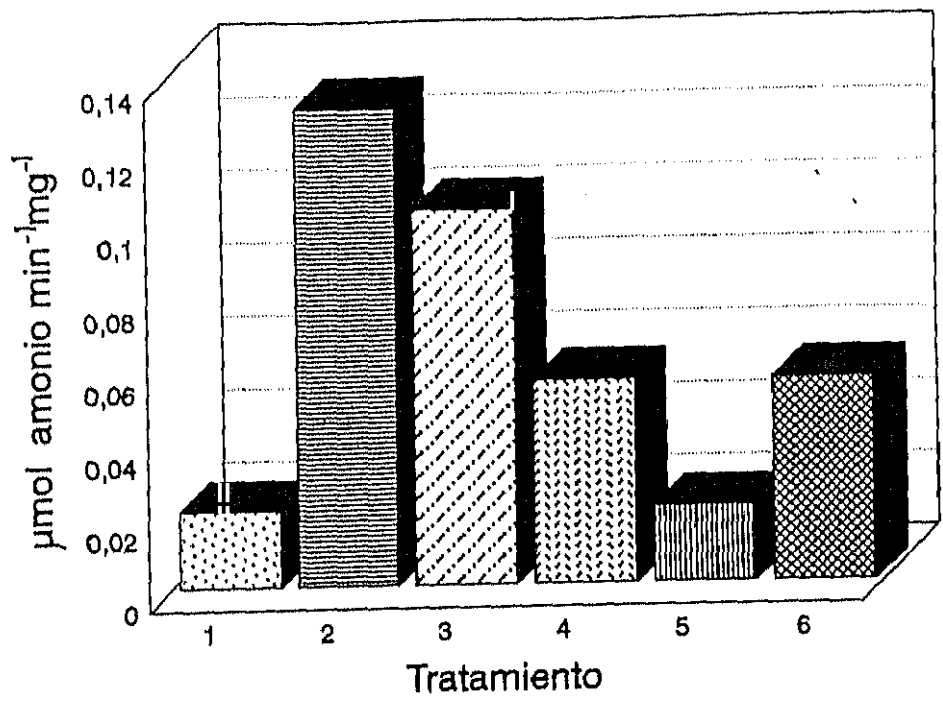
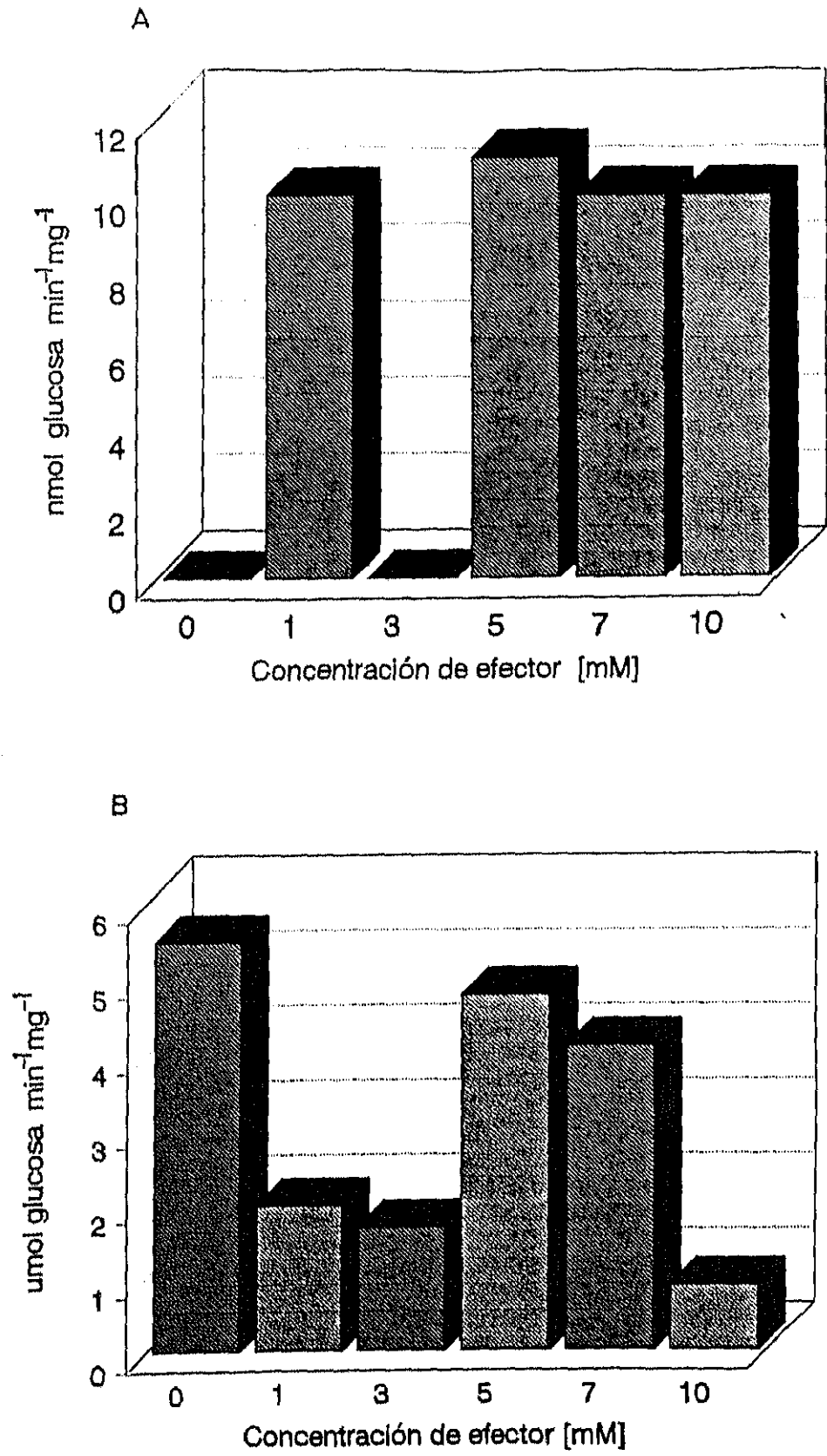


Fig. 59. Efecto de la concentración de putrescina en la actividad enzimática de glucanasa comercial de Sigma Chem. Co. (A) y en extracto libre de células obtenido a partir de fotobiontes de *X. parietina* aislados (B).



III. ESTUDIOS DEL AUTOBIONTE EN CULTIVO AXÉNICO

Se procedió al aislamiento y cultivo axénico en aposimbiosis de fotobiontes de *Xanthoria parietina*. Ante la dificultad de determinar la especie del endosimbionte (Gärtner, 1985) y dado que *Xanthoria parietina* esta constituida por *Trebouxia* y *Pseudotrebouxia* (Ahmadjian, 1982), nos referiremos al fotobionte como *Trebouxoides*. El siguiente objetivo era conocer el efecto de las isoformas en fotobiontes cultivados *in vitro* sin contacto directo con el micobionte así como valorar la capacidad de unión de la isolectinas a cultivos juvenes de un mes.

Trebouxoides fueron aislados del componente fúngico tal como se indicó en el apartado 17.3 de material y métodos. La Fig. 60 recoge imágenes del ascomicete de *Xanthoria parietina*. Los apotecios de este hongo producen ascosporas bipolares que aparecen en cultivo en grupos de 7 ó 8. La Fig. 60 muestra estas esporas inmediatamente después de la esporulación (Fig. 60.A) y en los primeros momentos de la germinación en BBM (Fig. B). El micelio de este hongo cultivado durante un mes en medio LBM 4% glucosa se muestra en la Fig. 60.C observándose un perfecto estado del hongo aislado del alga junto con el desarrollo de cuerpos de reserva, septos, gemaciones, etc. (Fig. 60.C). De igual manera el fotobionte se desarrollo perfectamente en cultivo axenico en medio sólido y liquido BBM. A continuación se hizo el estudio detallado de estos cultivos.

1.- ESTUDIO MORFOLOGICO Y ENZIMATICO DE FOTOBIONTES EN CULTIVO

La Fig. 61 muestra la micrografia obtenida de fotobiontes en cultivo axénico durante dos mes. Como se observa claramente tanto en la imagen con luz blanca (Fig. 61.A) como con luz polarizada (Fig. 61.B), se trata de muestras de cultivos sin contaminaciones bacterianas o fúngicas. Por otra parte, la microscopía de interferencia de fase color nos permitió apreciar relieves celulares, pudiendo distinguir

claramente los cuerpos de almacenamiento del cloroplasto y del núcleo celular. Tanto la Fig. 61 en color como las micrografías en blanco y negro que aparecen en la Fig. 62 muestran un perfecto estado estructural y morfológico sin alteraciones apreciables en las estructuras celulares, ni tras la observación con luz polarizada (Fig. 62. A) ni con luz blanca (Fig. 62. B).

Tal como se observa en la Fig. 63.A y 63.B se trata de un cultivo asincrónico con una gran variabilidad en los tamaños celulares y del estado de desarrollo de las mismas. Ambas micrografías recogen diferentes estados del desarrollo de los *trebouxoides* en su ciclo celular. Autoesporas de distintos tamaños originan células adultas capaces de entrar en mitosis formando autoesporangios. La rotura de la pared de la célula madre produce nuevamente autoesporas cerrando el ciclo mitótico del simbionte fotoautótrofo.

La Fig. 64 recoge distintos estados de división. La Fig. 64.A muestra una célula en su primera división mitótica que aún no ha finalizado la citocinesis (división celular no vegetativa típica de *Pseudotrebouxia*). Autoesporas contenidas en el autoesporangio aparecen en la Fig. 64.B (división celular vegetativa típica de *Trebouxia*). Un elevado número de células madre o autoesporangios revelan que el cultivo no tiene limitaciones de desarrollo y crecimiento en contraste con lo observado en poblaciones naturales del endosimbionte en talos recién aislados (Fig. 12)

En ningún caso se detectó actividad ureasa en pared en cultivos axénicos, a no ser que fueran previamente incubados en urea 100 mM durante 4h (Fig. 65). Cuando las células fueron incubadas con SA directamente, sin inducir el receptor de pared, no se detectó actividad ureasa (Fig. 65). En este caso, la SA debía entrar en el interior celular, provocando en 30 min de incubación rotura de paredes y formación de protoplastos y fantasmas, tal como muestra la micrografía de la Fig. 66, en luz blanca (Fig. 66.A) y en luz polarizada (Fig. 66.B). La formación de los protoplastos ocurrió a partir de un punto de rotura de la pared, saliendo al medio el contenido citoplasmático y rompiéndose en algunos casos la membrana plasmática, quedando todo el material celular disperso en el medio (Fig. 67). Tal

como se observa en esta micrografía, SA es capaz de penetrar en las células independientemente de su estado de desarrollo, dañando células adultas, autoesporangios y autoesporas (Fig. 67.A y 67.B). En los estados más avanzados del proceso de degradación, sólo se observaron estructuras de pared colapsadas, con restos celulares en sus proximidades (Fig. 68.A). Las distorsiones en la pared resultan más evidentes al observar los cultivos con luz polarizada (Fig. 68.B).

Sin embargo, cuando los fotobiontes presentaban actividad ureasa en pared, la arginasa segregable debía ser retenida a nivel de la pared celular del fotobionte, manteniéndose la estructura y desarrollo celular, como se observa en la Fig. 69 por microcopia de luz blanca (Fig. 69.A) y al observarlas por interferencia de fase (Fig. 69.B).

La Fig. 70 (A y B) muestra un grupo de células de estos cultivos en detalle donde se observan estructuras tales como pared celular, cuerpos de reserva, cloroplastos, etc., sin notarse diferencias al compararlas con los cultivos control. Durante el periodo de incubación de los fotobiontes en urea 100 mM durante 4 h las células no modificaron sus estados de desarrollo, observándose células adultas, células en división (Fig. 71.A) así como productos mitóticos en el interior del autoesporangio (Fig. 71.B).

La unión de las dos isoformas de arginasa ABP y SA produjo una disminución en la actividad ureasa en pared de forma análoga a lo que ocurría con fotobiontes recién aislados (Tabla 1, Fig. 55). En el caso de fotobiontes cultivados, la ABP anuló totalmente la actividad ureasa en pared mientras que la SA redujo la actividad hasta un 93,5% (Fig. 65). Conviene señalar que únicamente en el caso de inducción previa se observó actividad ureasa en paredes.

2.- ESTUDIOS DE LIGAMIENTO CON ISOLECTINAS MARCADAS EN CULTIVOS APOSIMBIONTES

Las proteínas marcadas con fluoresceína y no marcadas con el fluorocromo fueron incubadas con células del ficobionte previamente incubadas en urea o sin tratamiento previo. Tras la incubación de las proteínas con el fotobionte durante 30 min, se observaron las células por microscopía de fluorescencia. Un 98,7% de los fotobiontes control emitían fluorescencia roja procedente de la clorofila fisiológicamente activa. Los fotobiontes incubados en urea no presentaban diferencias respecto al control. Cuando se incubaron los fotobiontes inducidos con ABP o SA marcadas, se observó un elevado porcentaje de fluorescencia amarillo-verdosa fundamentalmente en SA marcada no observándose claramente esta unión en el caso de la ABP (Tabla 13). Sin embargo, si las células carecían de actividad ureasa en su pared, la unión al receptor no era posible y el porcentaje de fluorescencia amarilla se reducía hasta tomar valores entre 2,5 y 3,5%.

Tal como muestra la Tabla 12, cuando las proteínas no fueron marcadas y penetraron en las células, se observó un porcentaje de fluorescencia amarilla, 10,10% en el caso de ABP y 14,5% en el caso de SA. Esta fluorescencia es mayor que en el mismo ensayo utilizando isolectinas marcadas. Esto hizo pensar que tal fluorescencia procedía del efecto de la posible entrada de las proteínas en el interior celular y los subsiguientes cambios y alteraciones celulares como consecuencia de la actividad arginasa de estas isolectinas. Cuando las que se incorporaron al interior celular fueron las proteínas marcadas, se detectó un porcentaje de fluorescencia amarillo-verdosa muy bajo, puesto que las lectinas reducían la actividad arginasa tras la unión a fluoresceína (Tabla 2).

Si las células contenían actividad ureasa tras la unión, tanto de ABP como de SA, posiblemente no penetraban en el interior celular. En este caso, el porcentaje de fluorescencia amarilla-verdosa debido a degradación celular se reducía considerablemente (Tabla 13).

Tabla 13. Porcentaje de fluorescencia roja, amarilla y verde de fotobiontes de *Xanthoria parietina* tras los distintos tratamientos. También se indica el número de células total contabilizadas en cinco campos ópticos elegidos al azar.

Tratamiento	% Rojo	% Amarillo	% Verde	% Amar.+Verde	Total
Fotobiontes aislados e incubados en urea + SA ^{FI}	46,6	33,7	19,7	53,4	1.019
Fotobiontes aislados e incubados en urea + SA	98,2	0,16	1,64	1,80	621
Fotobiontes aislados e incubados en urea + ABP ^{FI}	93,9	0,23	5,87	6,10	427
Fotobiontes aislados e incubados en urea + ABP	93,5	2,50	4,00	6,50	154
Fotobiontes recién aislados + SA ^{FI}	97,3	0,70	2,00	2,70	445
Fotobiontes recién aislados + SA	85,5	6,10	8,40	14,5	504
Fotobiontes recién aislados + ABP ^{FI}	96,6	0,00	3,40	3,40	534
Fotobiontes recién aislados + ABP	89,9	0,25	9,85	3,10	398

Fig. 60. Microscopía óptica en luz polarizada de fotobiontes de *X. parietina* incubados durante dos meses en condiciones axénicas. (A) Esporas tras la esporulación en BBM; (B) inicio de la germinación después de 24 h en BBM; (C) desarrollo del micelio tras un mes de cultivo en LBM. La barra indica 35 μm .

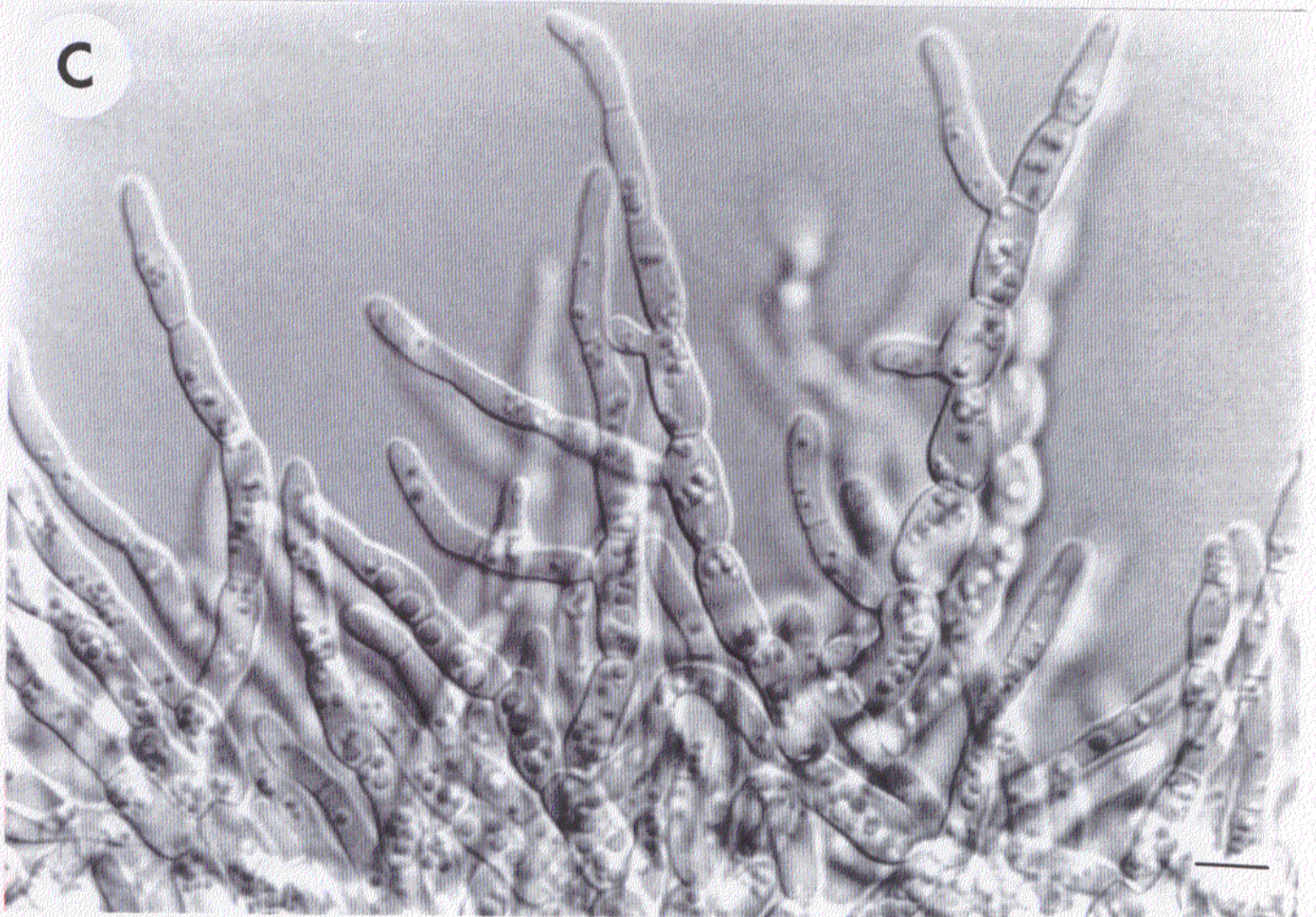


Fig. 61. Microscopía óptica color en luz blanca (A) y luz polarizada (B) de fotobiontes (trebouxoides) incubados en condiciones axénicas durante un mes. La barra indica 35 μm .

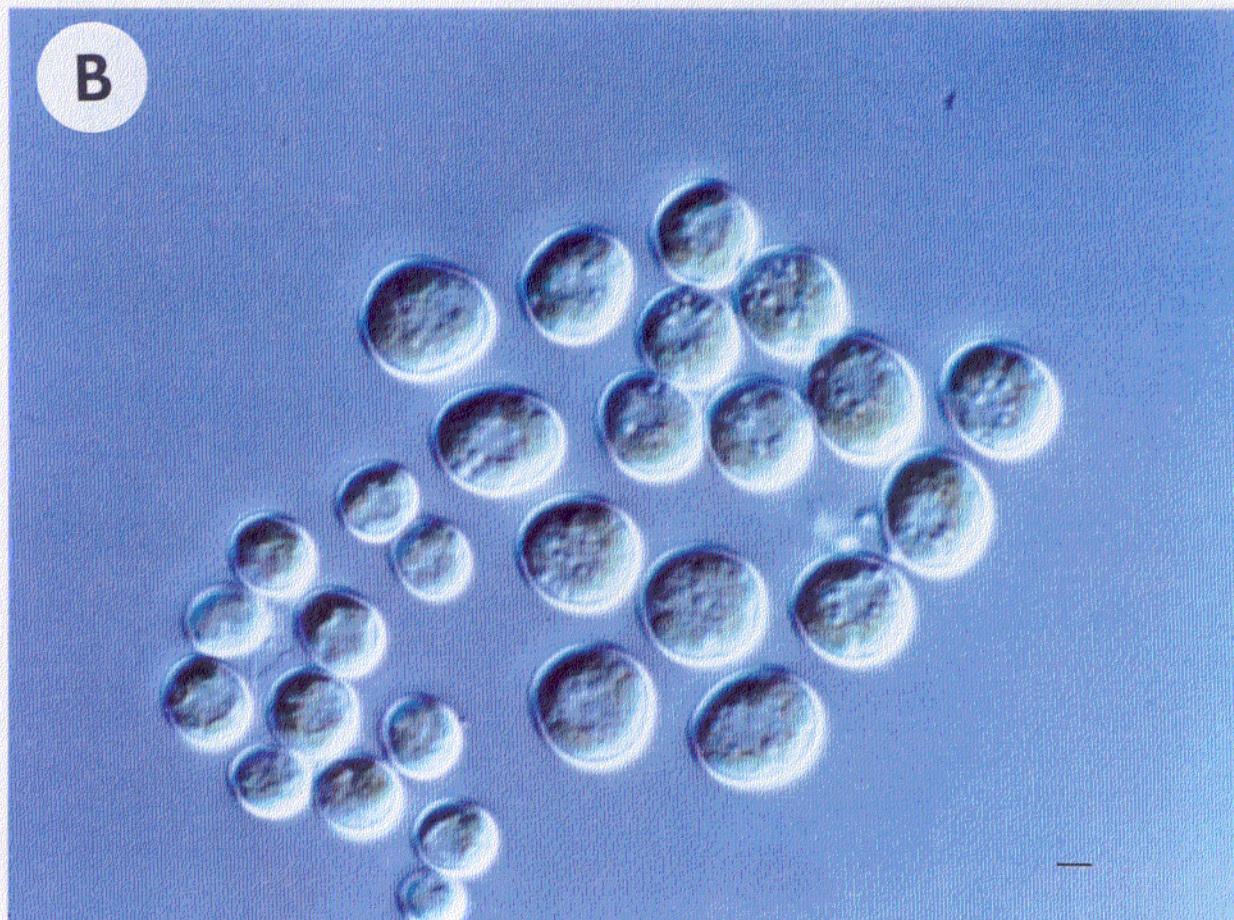
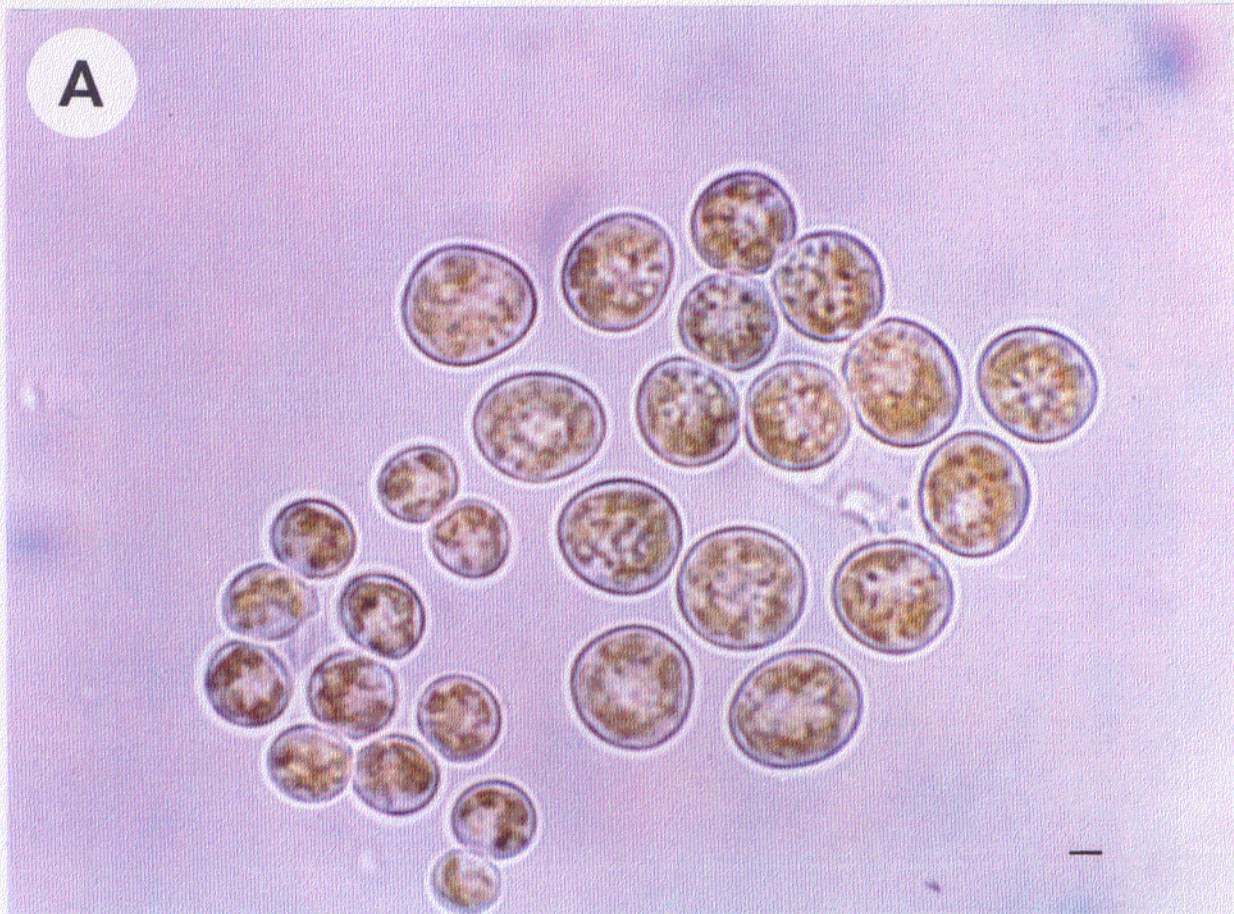


Fig. 62. Microscopía óptica en luz polarizada (**A**) y luz blanca (**B**) de trebouxoides incubados en condiciones axénicas. Diferentes estados del desarrollo. La barra indica 35 μm .

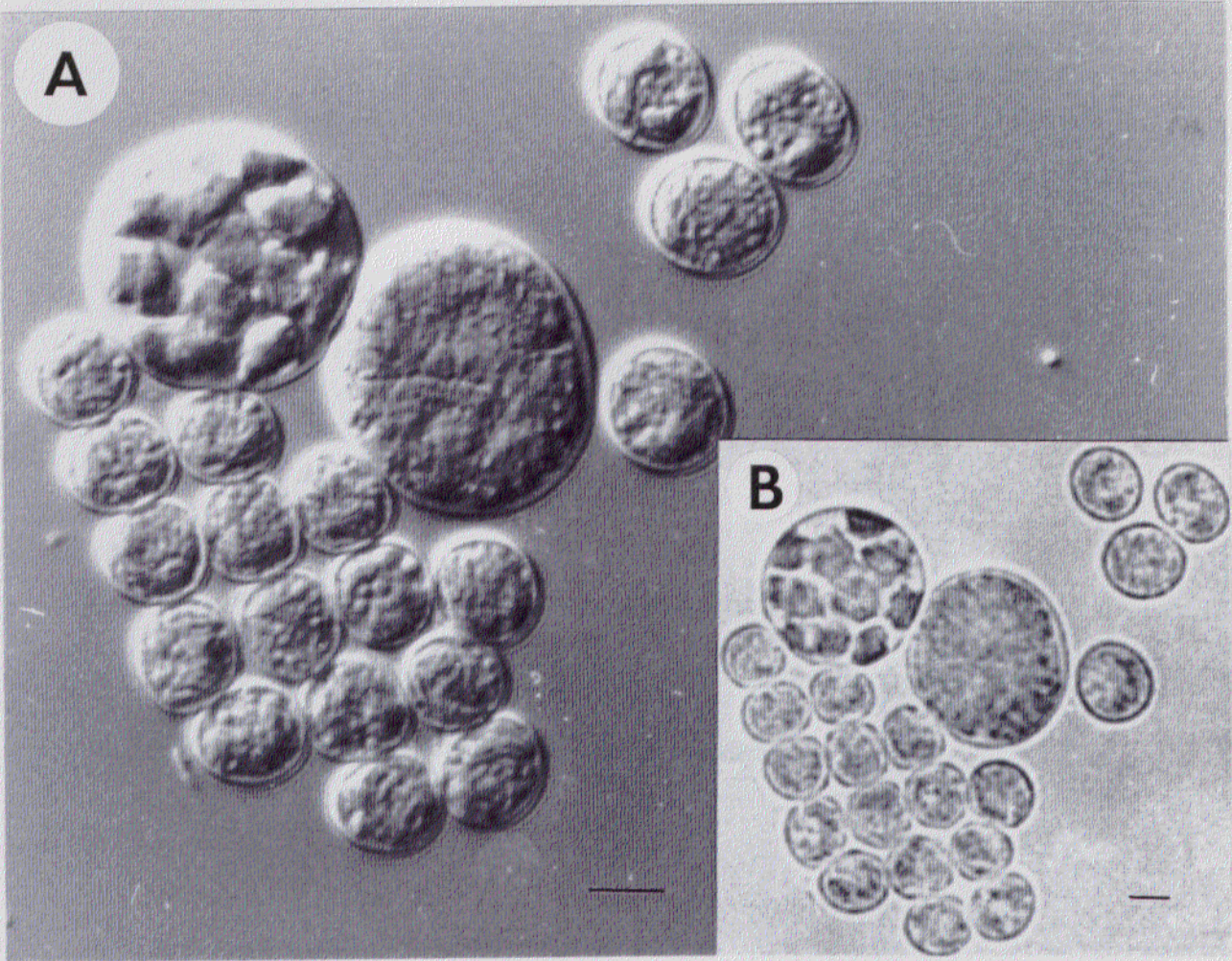


Fig. 63. Microscopía óptica en luz polarizada. Ciclo celular de fotobiontes del género *Trebouxia* en cultivo (A) y (B). Obsérvese el elevado número de aplanosporangios en (B). A, autospora; AP, aplanosporangios; CD; Célula adulta. La barra indica 35 μm .

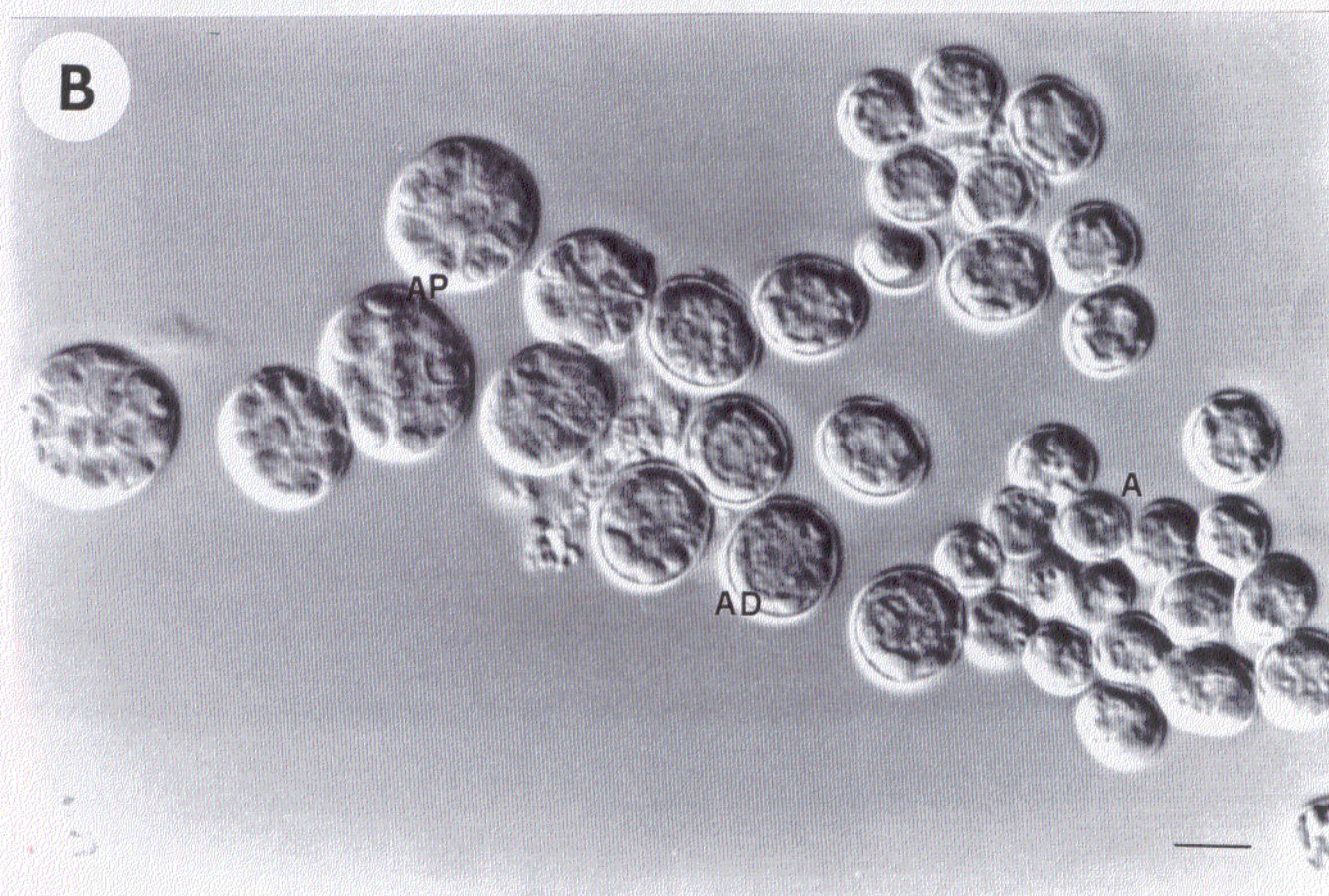
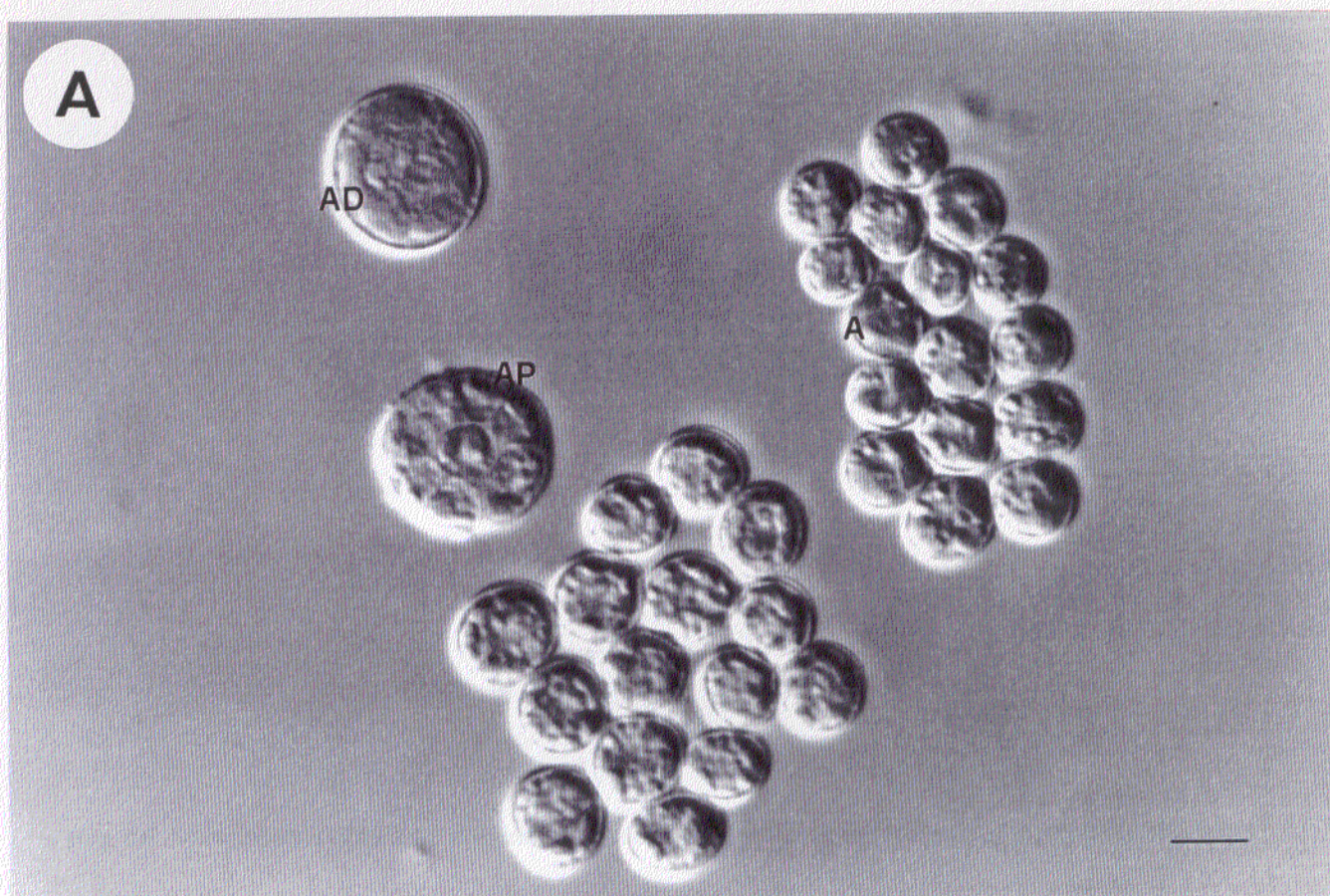
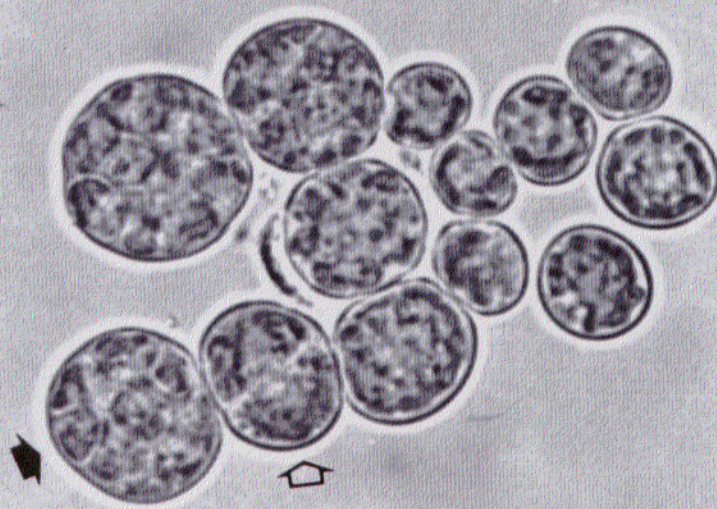


Fig. 64. Microscopía óptica de diferentes formas de división de los trebouxoides que constituyen el endosimbionte en *X. parietina*. **(A)** Fotomicrografía en luz blanca donde se observan *Pseudotreboxia* en división (flecha vacía) y *treboxia* en división (flecha llena). **(B)** División celular a partir de una célula que conservó la pared celular de la célula madre (poco frecuente en *X. parietina*). La barra indica 35 μm .

A



B



Fig. 65. Actividad ureasa en paredes de los trebouxoides en cultivo de *X. parietina* tras los siguientes tratamientos: fotobiontes incubados en urea 100 mM durante 4h y después durante 3h en tampón (1), o en ABP (2) o en SA (3); fotobiontes incubados durante 4h en tampón y posterior incubación en tampón (4) o ABP (5) o SA (6) durante 3h.

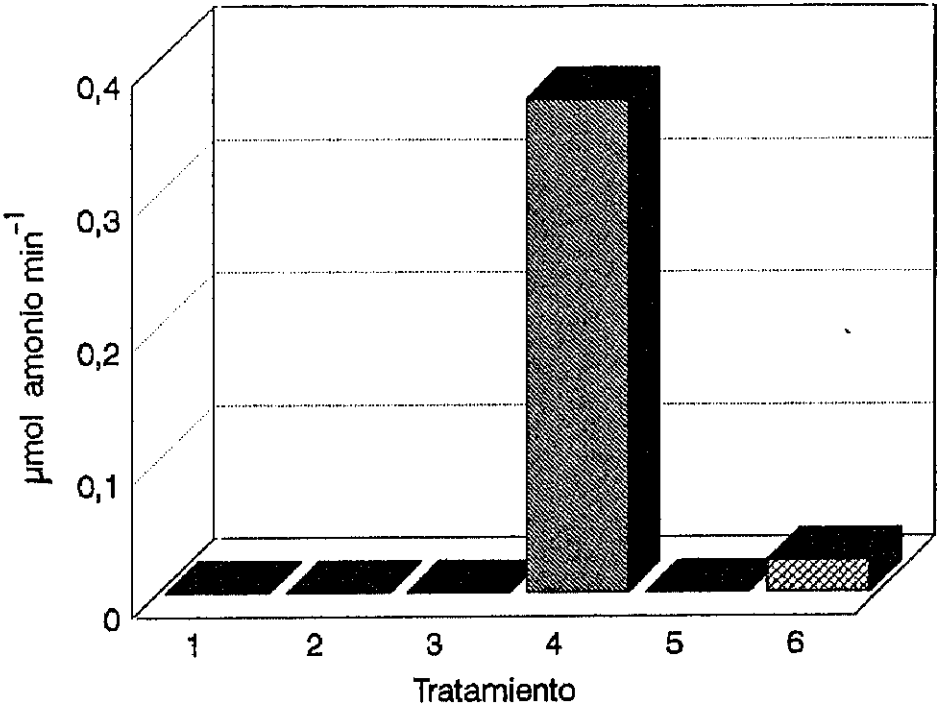


Fig. 66. Microscopía óptica de luz blanca (**A**) y luz polarizada (**B**). Fotobiontes incubados durante 30 min en SA. La flecha llena indica la formación de protoplastos y la flecha vacías los fantasmas. La barra indica 35 μ m.

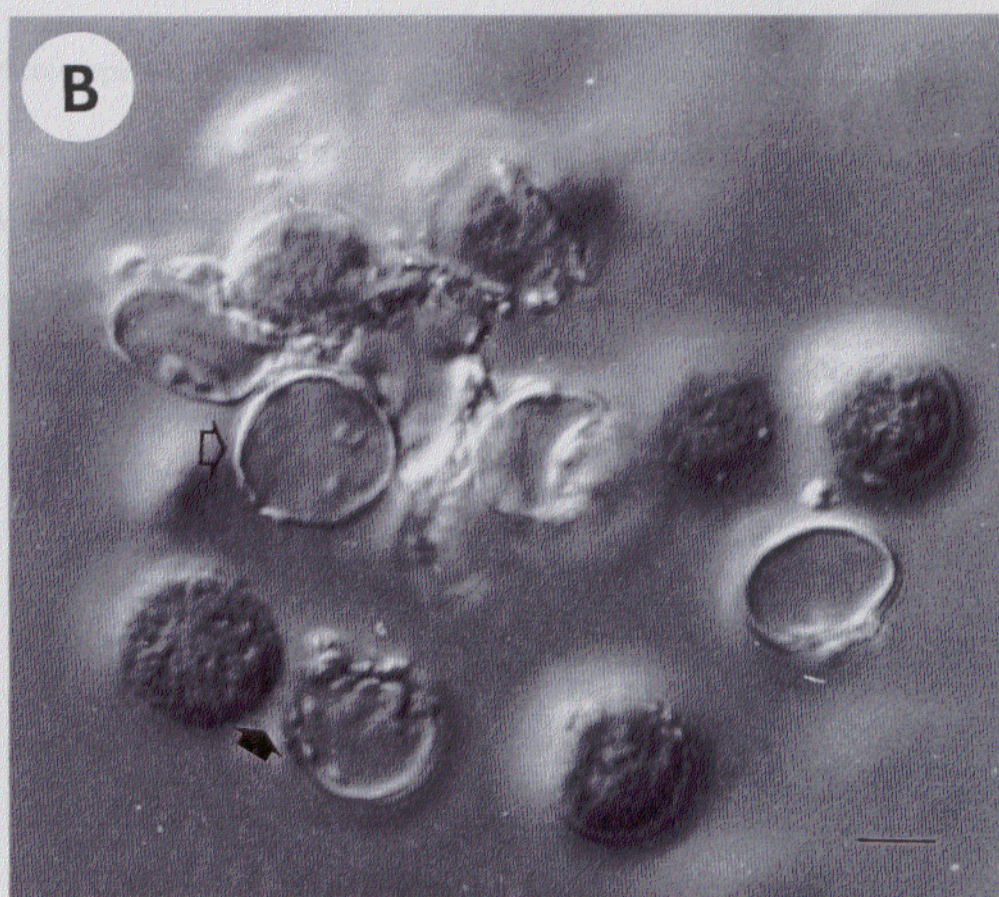
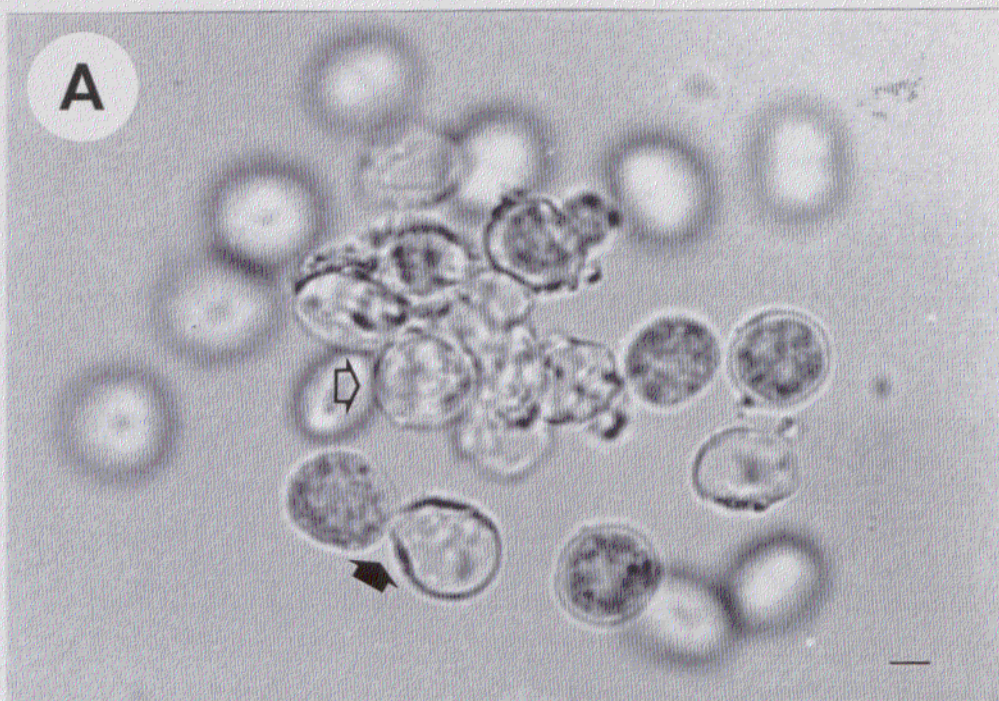
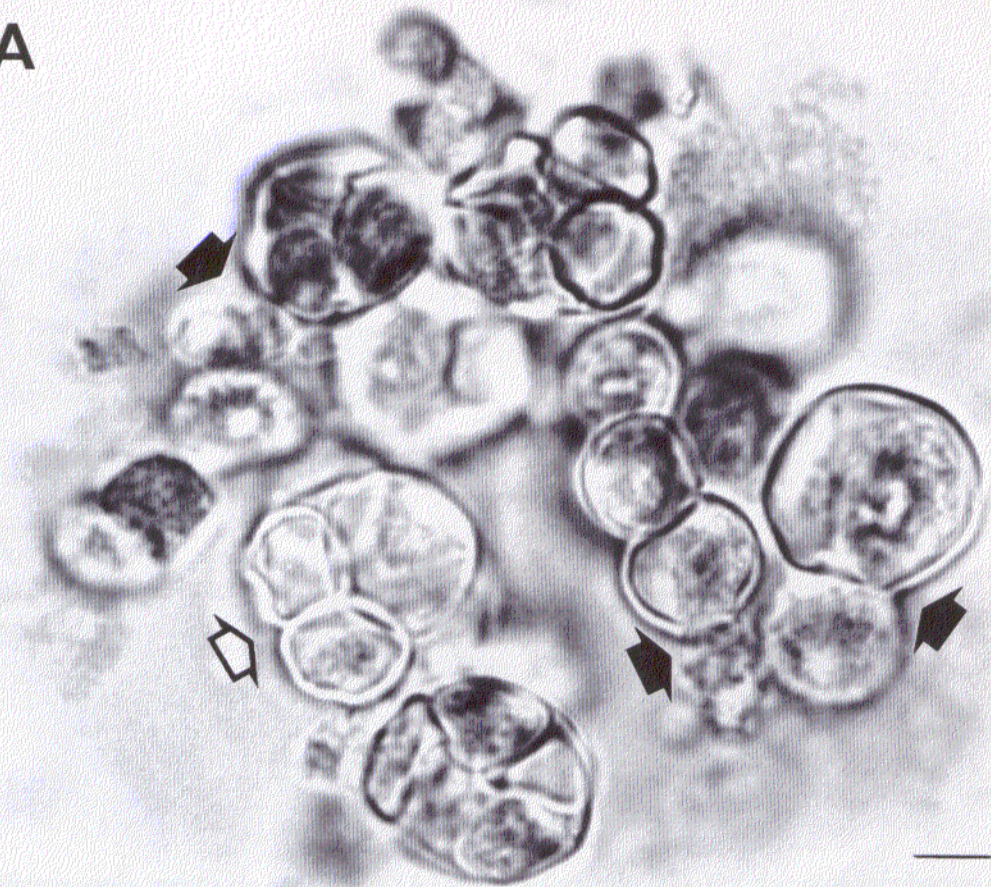


Fig. 67. Microscopía óptica de luz blanca (A) y luz polarizada (B). Fotobiontes incubados durante 30 min en SA. La flecha llena indica formación de protoplastos y la flecha llena, fantasmas. Nótese que los daños morfológicos se observan en células pertenecientes a todos los estadios del desarrollo. La barra indica 35 μ m.

A



B



Fig. 68. Microscopía óptica de luz blanca (A) y luz polarizada (B). Fotobiontes incubados en SA durante 30 min. Obsérvese el aspecto final de las células tras haber perdido todo el contenido citoplásmico. La barra indica 35 μm .

A



B

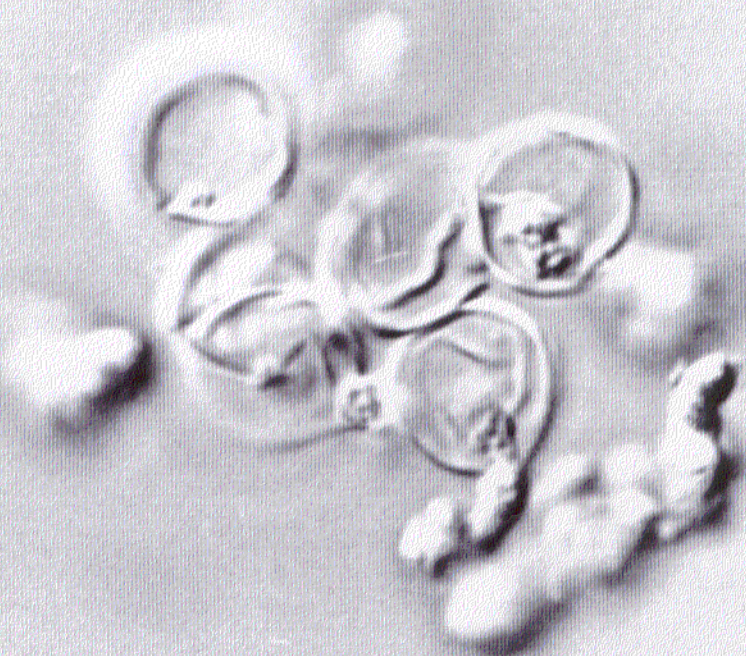


Fig. 69. Microscopía óptica de luz blanca (A) y luz polarizada (B). Fotobiontes incubados en urea 100 mM durante 4h y posteriormente incubados en SA durante 30 min. No se observaron modificaciones drásticas en la estructura celular. La barra indica 70 μ m.

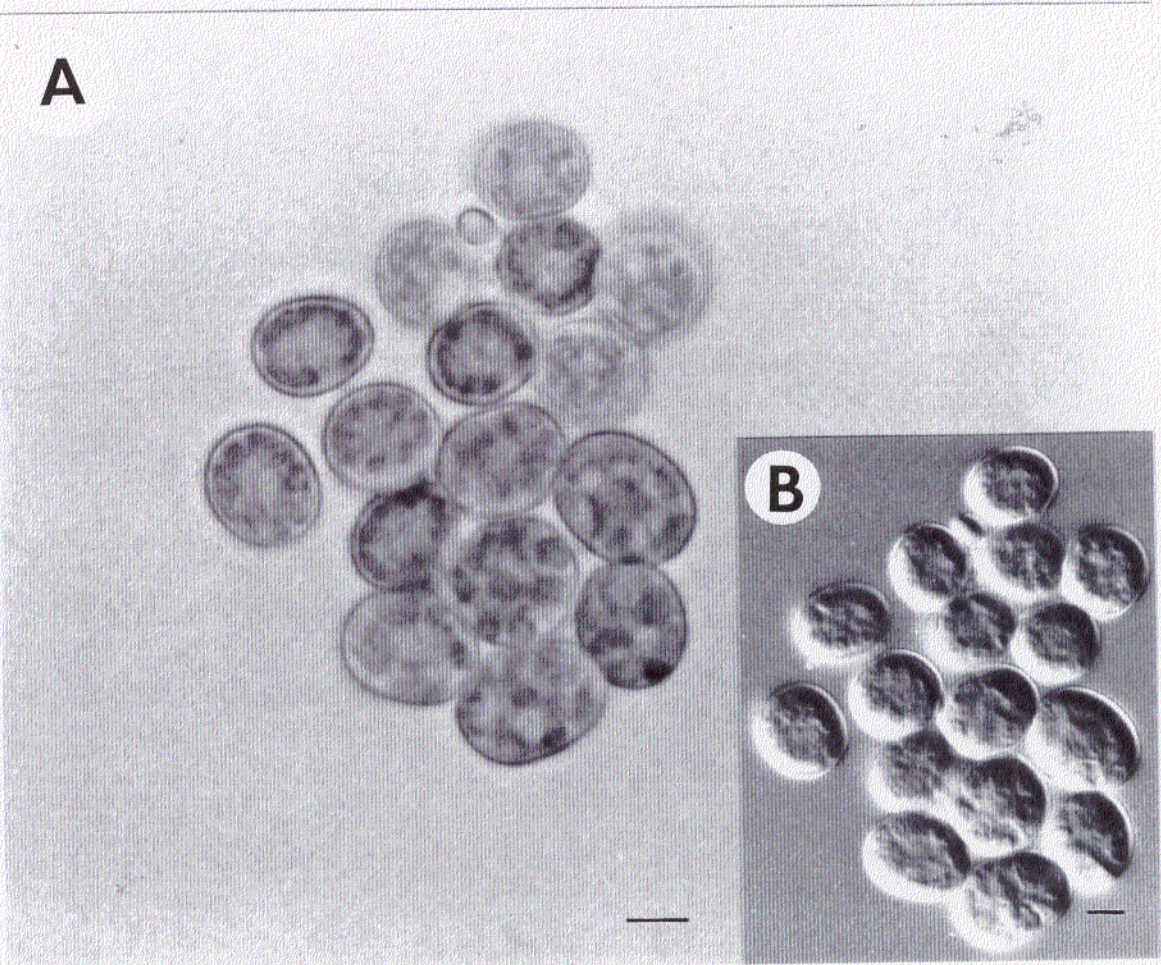


Fig. 70. Microscopía óptica de luz blanca (**A**) y luz polarizada (**B**). Fotobiontes incubados en urea 100 mM durante 4h e incubadas posteriormente en SA durante 30 min. Detalle de la estructura y relieve celular. La barra indica 35 μ m.

A



B

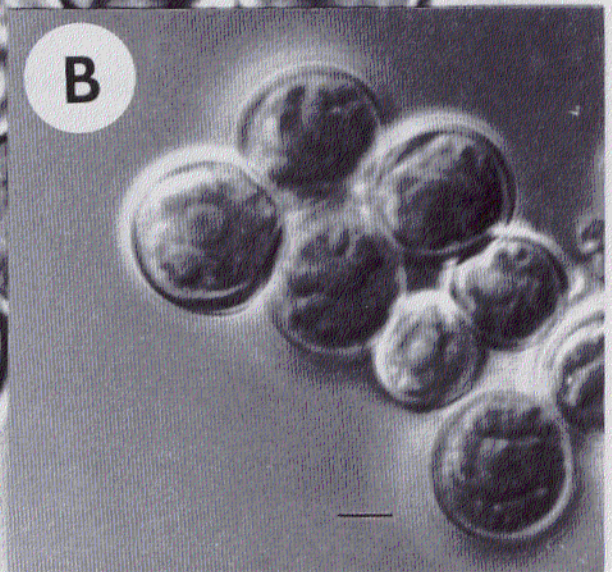
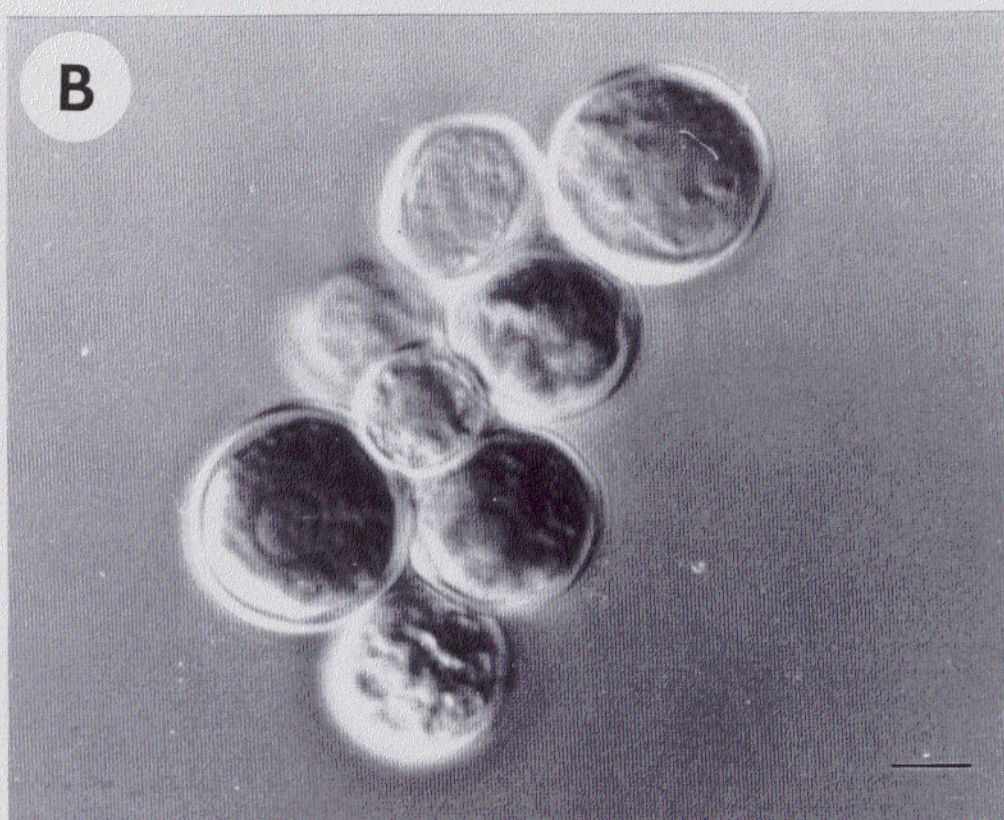
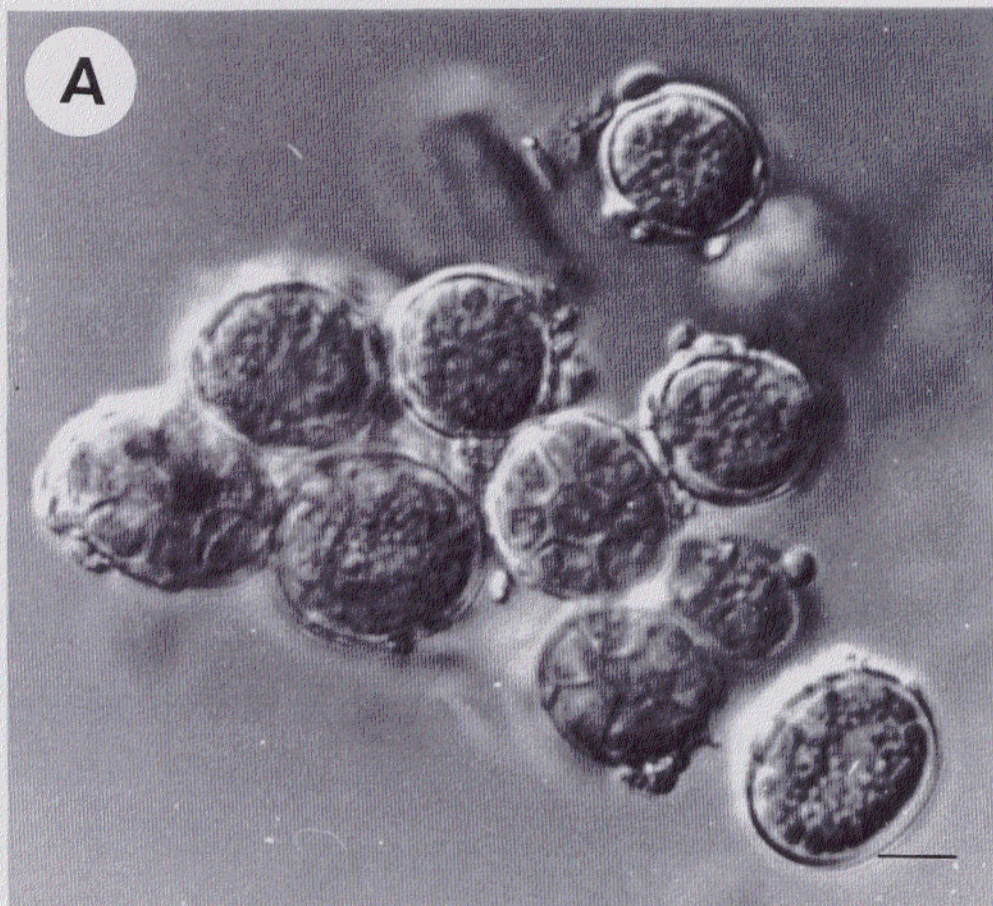


Fig. 71. Microscopía óptica en luz polarizada. Fotobiontes incubados en urea 100 mM durante 4h e incubadas posteriormente en SA durante 30 min. La glicoproteína no afectó ni a aplanosporangios (A) ni a células adultas (B). La barra indica 35 μ m.



DISCUSIÓN

Una lectina del líquen *Xanthoria parietina* (Fig. 1) fue parcialmente purificada de acuerdo con Bubrick *et al.* (1985). Esta lectina, que es sintetizada por el hongo y está localizada en la superficie de su pared (Bubrick y Galun 1980; Bubrick *et al.*, 1981), se resolvió en dos fracciones por filtración en columna de Sephadex G-150 (Fig. 4). Una de ellas eluyó en el volumen muerto y se trataba de una proteína no glicosilada (Fig. 5) con un peso molecular superior a 150 kDa y con capacidad para hidrolizar arginina. La fracción mayoritaria tenía un peso molecular inferior, una mayor actividad arginasa y se comportaba como una proteína glicosilada (Figs. 4 y 5). Galun *et al.* (1984), resolvieron esta mezcla heterogénea por electroforesis en poliácridamida al 12% en dos proteínas de 12 kDa y 43 kDa, siendo la primera de ellas una proteína glicosilada. Sin embargo, no describieron ningún tipo de actividad enzimática para estas proteínas. Estas diferencias en el peso molecular podrían explicarse en base al comportamiento de agregación de las arginasas al ser eluidas de geles de Sephadex (Ikamoto *et al.*, 1990) e incluso a la agregación en disolución que se observa en numerosas lectinas (Mandal y Brewer, 1992; Gupta y Brewer, 1994). Sin embargo, Sankaranayanan *et al.*, (1993) muestran cómo al aumentar la concentración de las lectinas y eluir las de Sephadex, las lectinas mantienen la estructura de dímero que mostraban a baja concentración y no se agregan. En cualquier caso, la filtración de una proteína parcialmente pura por Sephadex o por electroforesis no permite realizar una estimación del peso molecular hasta no realizar la purificación total de la misma. De hecho, la separación de la lectina mediante una técnica altamente resolutive como la exclusión molecular en HPLC resolvió la muestra en seis polipéptidos, dado que el poder de resolución de esta técnica es superior a la electroforesis convencional (Fig. 19.A). En cualquier caso, se puede separar dos fracciones con actividad arginasa que pueden corresponder a dos enzimas (o más) que hidrolizan arginina. Estas fracciones contienen arginasas constitutivas que se describirán como isoformas de arginasa, puesto que se desconoce si son codificadas por el mismo o distinto locus y por otra parte, se sabe que al menos una de las fracciones contiene una arginasa (arginasas) glicosilada(s) (Griffiths y Black, 1987). En este sentido, Shannon y

Hankins (1981), describen en plantas superiores dos proteínas con actividad Ó-galactosidasa, una de ellas se comportaba como una fitohemaglutinina (glicoproteína) y la otra carecía de esta capacidad por lo que sugieren diferentes funciones fisiológicas para estas isoformas atendiendo a esta característica.

El marcaje de lectinas con distintos fluorógenos con objeto de detectarlas o determinar el sitio de unión al microscopio óptico es una técnica habitual (Marx y Peveling, 1983; Kárdish, 1991; Jonas y Putzke, 1992; Jonas *et al.*, 1993). Cuando se realizó el ligamiento de la lectina heterogenea marcada con fluoresceína a fotobiontes, se encontró un 11% de fotobiontes con fluorescencia amarilla (Fig. 11 A). Estos resultados contrastan con los descritos por Bubrick *et al.* (1980) y Marx y Peveling (1983) puesto que estos autores sólo obtienen unión de las lectinas aisladas de líquenes con fotobiontes en cultivo. Los experimentos subsiguientes pueden explicar estos resultados en base a la presencia o ausencia de actividad ureasa en los talos recogidos de la naturaleza (Rodríguez y Vicente, 1991), e incluso, la presencia o ausencia del receptor puede depender del estado fisiológico del talo (Lallemant y Savoge, 1985). Esta suposición ha sido confirmada al incubar los talos intactos con urea durante 2h pues en este caso, aunque no aumenta el número de fotobiontes con fluorescencia amarilla si se observa una marcada intensidad de la misma (Fig. 11. E).

Además, el cultivo de los fotobiontes aislados en urea durante un periodo de tiempo suficiente como para inducir la presencia de ureasa en pared (Fig. 6) incrementó claramente el número de células que eran capaces de unir la lectina a su pared celular (Fig. 11 A y C), encontrando que las diferencias obtenidas en el número de células fluorescentes en este tratamiento respecto a los otros dos eran estadísticamente significativas (Tabla 3). Por otra parte, si el componente fúngico es capaz de producir su propia ureasa, esta enzima no puede actuar como receptor dado que las contaminaciones de hifas no presentan fluorescencia amarilla (Fig. 11 C y D), aunque en algunos casos las esporas del hongo presentan cierta fluorescencia independientemente del tratamiento a que han sido sometidas (Fig. 11 A, C y D).

Por otra parte, Bubrick y Galun (1980) defienden la especificidad en la unión describiendo esta lectina como una proteína de reconocimiento de fotobiontes compatibles con el hongo para formar la simbiosis, puesto que fotobiontes en cultivo axénico de *X. parietina* (Fam. *Telochistaceae*) son capaces de unir la lectina, pero fotobiontes en cultivo de distintas especies de *Ramalina* (Fam. *Ramalinaceae*) son incapaces de llevar a cabo esta unión. Sin embargo, trabajos posteriores (Bubrick *et al.*, 1985) describen resultados contradictorios puesto que el porcentaje de unión con fotobiontes de *X. steineri* es inferior al 10%. En este sentido, fotobiontes de *Evernia prunastri* (Fam. *Usneaceae*) que presentan ureasa en pared eran capaces de unir la lectina extraída de *X. parietina* (Fig. 11.F) a pesar de ser líquenes filogenéticamente muy separados. Incluso las contaminaciones fúngicas en las preparaciones obtenidas presentaban fluorescencia positiva. Ante los resultados obtenidos parece que la unión de la lectina depende fundamentalmente de la presencia o ausencia del receptor de pared y no de la naturaleza u origen del fotobionte. Esto también implica que no es necesario un cultivo por largos periodos de tiempo en un medio inespecífico de crecimiento, sino que basta una corta incubación sobre un inductor adecuado.

El elevado porcentaje de unión obtenido en cultivos axénicos del fotobionte de *X. parietina* (Bubrick *et al.*, 1985), hace pensar que el cultivo aposimbionte puede ser decisivo para inducir la presencia del receptor adecuado, ocurriendo un bloqueo (o inhibición) del receptor después del reconocimiento. En este sentido, la presencia de parietina en las paredes de las algas liquenizadas (Honegger, 1991; Smith y Douglas, 1987) y considerando que parte de estos fenoles pueden penetrar en el interior del alga (Ahmadjian y Jacobs, 1985; Avalos y Vicente, 1987), podría explicar que los fenoles en el talo inhiban la actividad ureasa, tal como ocurre con otros fenoles liquénicos que regulan actividades enzimáticas tales como ureasa (Vicente y Filho, 1979; Legaz y Vicente, 1988), arginasa (Legaz y Vicente, 1982; Legaz y Vicente, 1983; Pedrosa, 1993), etc. Tal como estos autores proponen, la activación o inhibición de las enzimas va a depender de la concentración y localización de los fenoles.

En este sentido, el co-aislamiento de parietina purificada de *X. parietina* (Figs. 7 y 8) junto con paredes que presentaban actividad ureasa inhibe esta actividad hasta anularla a altas concentraciones de la antraquinona (Fig. 9). Los fenoles forman normalmente enlaces covalentes con restos de cisteína, ligados a los centros activos de la enzima, y a restos prolina y alanina, involucrados en la polimerización (Vicente y Legaz, 1988). Sin embargo, la inactivación de la ureasa al aumentar la concentración de parietina no necesariamente debe afectar a la capacidad de ligamiento entre el receptor y el ligando puesto que la interacción proteína-proteína se realiza fundamentalmente a nivel de los restos glicosílicos y no necesariamente el sitio carbohidratado de la proteína tiene que estar relacionado con el centro activo. Balasubramanian, *et al.* (1993), describen cómo cambios en los restos aminoácidos modifican la conformación de la proteína pero no la especificidad en la unión al receptor ni en su efecto tóxico. Hoedemaeker *et al.*, 1993, muestra como cambios en los aminoácidos no modifican la interacción con el receptor pero si la estabilidad y toxicidad de la lectina. En este sentido, Viard *et al.* (1993) describen que el bloqueo del receptor, y por tanto, de la actividad aglutinante, no inhibe la capacidad antifúngica de la glicoproteína. Sin embargo, modificaciones en la composición de aminoácidos en la zona próxima al resto glicosílico puede afectar la capacidad de unión a los azúcares pues esta zona podría estar implicada en interacciones con iones metálicos (Young y Oomen, 1992). Atendiendo al porcentaje de algas ureasa positivas en fotobiontes inducidos con urea, de los que previamente se habían eliminado los fenoles podemos decir que el bajo porcentaje de unión (fluorescencia amarilla) obtenida en los anteriores experimentos no se debe a una modificación en el receptor de pared del alga por presencia de parietina (aunque existe una marcada inhibición enzimática), dado que el porcentaje de células ureasa positiva en los diferentes tratamientos (Tabla 3) fue muy similar al de células capaces de unir la lectina marcada (Tabla 5). Por otra parte, los tratamientos de inducción no inducen daños drásticos o muerte celular que pueda determinar o explicar el bajo porcentaje de unión lectina-fotobionte. (Tabla 4).

Una explicación plausible del bajo porcentaje de células fluorescentes puede apoyarse en la heterogeneidad de la población, como muestra la frecuencia de distribución de tamaños celulares (Fig. 12). El hecho de que las células más pequeñas ($10\text{-}200\text{ }\mu\text{m}^2$) no sean capaces de unir lectina (Fig. 11. C.) y que éstas constituyan el 60% de la población puede explicar el bajo porcentaje de fluorescencia. Este resultado está de acuerdo con Kardish *et al.*, 1991), quienes muestran que la unión de las lectinas a la pared celular depende del estado fisiológico del autosimbionte además de la composición de aquella (Bubrick *et al.*, 1982). Por otra parte, el elevado número de células pequeñas puede deberse a una fuerte velocidad mitótica o a una inhibición del crecimiento. En líquenes, la observación de aplanosporangios es poco frecuente (Slocum *et al.*, 1980) por lo que la primera posibilidad debe ser descartada. Cabe pensar, que el pequeño tamaño de las algas se deba a una inhibición del crecimiento por parte del componente fúngico, tal como sugiere Honegger (1987), debido a la pérdida de actividad metabólica, incluyendo la producción y secreción de ureasa (Vicente *et al.*, 1983).

Es posible pensar que tan bajo porcentaje de células con fluorescencia amarilla pueda deberse a un problema de marcaje de las proteínas. Sin embargo, de los cuatro polipéptidos (Fig. 20. B) que constituían la lectina intratalina todos fueron marcados (Fig. 20. A). El marcaje del polipéptido (o polipéptidos) con actividad arginasa se comprobó puesto que la lectina parcialmente purificada y marcada redujo su actividad arginasa aproximadamente un 50% frente a la no marcada como consecuencia del marcaje, tal como se comprobó con arginasa comercial (Tabla 2). Por otra parte, la posibilidad de que algún péptido no marcado de la mezcla pueda bloquear el receptor debe ser descartada. Por tanto, el polipéptido o polipéptidos capaces de unirse a los fotobiontes se marcan en su totalidad mediante el proceso anteriormente indicado atendiendo a los resultados obtenidos y considerando la unión al azar polipéptido-fluoresceína y la presencia de fluorescencia en exceso en la mezcla de reacción. Es posible, sin embargo, que existan interacciones polipéptido-polipéptido que

dificulten la unión a los receptores del alga, de forma similar a lo que ocurre con otras arginasas (Pedrosa y Legaz, 1991b) y otras lectinas (Gupta y Brewer, 1994).

Las observaciones preliminares a nivel óptico que correlacionaban la presencia de ureasa en pared con la capacidad del fotobionte para unir la lectina sintetizada por el hongo se confirmaron a nivel ultraestructural y bioquímico. La lectina marcada con ferritina se unió a la paredes de los fotobiontes inducidos en un porcentaje similar a cuando se marcó con fluoresceína (Fig. 13.B) y sin embargo, no se observó la unión de esta proteína densa a los electrones como consecuencia del marcaje cuando las paredes no mostraban ureasa en pared (Fig. 13.A). La posibilidad de que los polipéptidos no hayan sido marcados con ferritina es improbable, puesto que la unión de la proteína, ferritina y polipéptidos se realiza al azar. La separación por Sephadex nos permite separar distintas fracciones. La fracción I, formada posiblemente por agregados ferritina-ferritina, la fracción II, con una alta actividad arginasa (similar a la lectina no marcada), posiblemente formada por agregados ferritina-ferritina y ferritina-arginasa, una fracción III donde se separan fundamentalmente péptidos no marcados sin actividad arginasa y una fracción IV sin proteína (Fig 10, Fig. 21, Tabla 2). Estos resultados confirman el marcaje de todas las proteínas con actividad arginasa (Fracción II) así como que este tipo de unión no afecta a la actividad enzimática de la lectina, quizás porque la unión se realiza a través de un intermediario (glutaraldehído), tal como se confirmó con arginasa comercial. Los polipéptidos no marcados aparecen como trazas sin importancia cuantitativa (Fig. 21. C).

Por otra parte, aquellos fotobiontes que fueron inducidos con urea durante 2h mostraron actividad ureasa positiva (27,13%, Tabla 5), tal como se confirmó a nivel electrónico (Fig. 18. A y B). Sin embargo, no se detectó esta actividad ureasa en fotobiontes control (Fig. 18.C). Cuando las muestras se trataron con un inhibidor específico de ureasa, no se observó actividad enzimática en ningún caso (Fig. 18.C) al igual que tras incubar los fotobiontes inducidos con la lectina (Fig. 18. F.), por lo que podemos afirmar que la unión de estas proteínas inhibe la actividad ureasa y establecer una

correlación entre la presencia de ureasa en pared del fotobionte y la unión de la lectina fúngica. En este sentido, la pérdida de la actividad enzimática de una lectina ha sido descrita para otras lectinas procedentes de plantas superiores (Shannon y Hankins, 1981). La inhibición de la actividad ureasa se confirma a nivel bioquímico (Tabla 1). En este caso, la unión de la proteína con actividad arginasa y el receptor de pared provoca una inhibición total de ambas proteínas. Este efecto podría tener implicaciones fisiológicas como se discutirá más tarde. La incubación de la lectina con fotobiontes no inducidos produce una ligera pérdida de la actividad arginasa en la lectina. Sin embargo, cuando se incuba con fotobiontes inducidos, la actividad se reduce hasta un 99%, lo que confirma la unión de la proteína a la pared del fotobionte. Un remanente de actividad arginasa queda en la preparación de lectina, lo que confirma la presencia de la isoforma constitutiva no glicosilada (Figs. 4 y 5) que no se une a paredes. La desorción con galactosa permite una recuperación de la actividad ureasa en algo menos del 50%. Sin embargo, la recuperación de actividad arginasa en la preparación tras la desorción es muy baja.

Estos resultados están de acuerdo con Petit (1982). Sus experimentos de inhibición de la aglutinación de proteínas de origen fúngico utilizando siete azúcares diferentes revelan que en ningún caso la lectina se unía a ninguno de ellos y por tanto, la aglutinación era positiva. Es posible, por tanto, que la desorción no pueda ser llevada a cabo con galactosa únicamente, porque el receptor de pared esté formado por un heterosacárido, tal como ocurre con otras proteínas glicosiladas en líquenes (Planelles y Legaz, 1987), a pesar de que esté descrito que el resto glicosílico de ureasa en *Evernia prunastri* es un homopolímero de galactosa (Perez-Urria y Vicente, 1989). La posibilidad de la presencia de otros receptores está de acuerdo con lo descrito por Marx y Peveling (1983) a cerca de la unión de Con A a fotobiontes de *X. parietina*, dado que los azúcares específicos de esta lectina son manosa y glucosa. Más concretamente, la lectina intratalina parcialmente purificada es capaz de interactuar con Con A, WGA, y RCA (Bubrick et al., 1985). En este sentido, Mo *et al.* (1993, 1994)

confirman la necesidad de utilizar mezclas de monosacáridos y oligosacáridos para inhibir la capacidad hemaglutinante de lectinas vegetales. Por otra parte, la interacción química entre el receptor y el ligando puede implicar no sólo al resto glicosílico, sino también a los aminoácidos de las proteínas de forma que la desorción total sea irreversible. E incluso la interacción arginasa-arginasa entre la lectina y pared (Tabla 1) podría ocurrir de forma similar a lo que ocurre con otra arginasas (Pedrosa y Legaz, 1991b). Cabe pensar, además, que se produzca desorción de la lectina pero que la interacción ligando-receptor sea tal que se inactiven total o parcialmente las arginasas.

Por último, la unión de la lectina a paredes se confirma ante la diferente observación con técnicas analíticas (HPLC) de la composición polipeptídica de la lectina antes y después de la adsorción (Fig. 19 A y B). El cromatograma diferencia entre los cromatogramas de ambas muestras revelan un único pico presente en la lectina no incubada y que desaparecía en el sobrenadante de la lectina tras la incubación. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Galun *et al.* (1984) y Bubrick *et al.* (1985) quienes muestran cómo un polipéptido glicosilado de la lectina se une a fotobiontes en cultivo axénico.

Ante los datos precedentes, la cuestión principal es establecer el posible papel fisiológico de esta proteína glicosilada con actividad arginasa. La arginasa es la enzima que dispara la síntesis de putrescina en el micobionte mientras que la biosíntesis de esta diamida en el fotobionte parece ser dependiente de arginina descarboxilasa (Legaz, 1985). Si esta arginasa no queda retenida en el talo, como ocurre en el 70% de los fotobiontes, podría penetrar en las células por endocitosis como ocurre con otras lectinas (Jonas, *et al.*, 1992). La cantidad de putrescina algal en talos de *E. prunastri* es 0.62 % de la putrescina total (Escribano y Legaz, 1988). El incremento experimental de la concentración de putrescina algal está relacionado con el incremento de actividad proteasa (Escribano y Legaz, 1985), metabolismo de azúcares (Legaz *et al.*, 1985) y degradación de clorofilas (Vicente y Legaz, 1983). Es de suponer que los fotobiontes regulan el metabolismo de las poliaminas para mantener un porcentaje de putrescina

bajo. Si la lectina con actividad arginasa entra en el fotobionte y si, por otra parte el fotobionte es capaz de absorber arginina del medio intratalino la concentración de poliaminas en el fotobionte aumentaría pudiendo provocar el deterioro celular. El papel de las poliaminas en la senescencia en plantas superiores es discutible (Kao, 1993, 1994), y sin embargo, en cianobacterias induce letalidad (Guarino y Cohen, 1979 a y b) y disminución de la concentración de clorofilas en clorolíquenes (Legaz y Vicente, 1983). Tal hipótesis fue confirmada mediante la incubación de fotobiontes recién aislados con la lectina intratalina durante tres horas tras cebar las algas con arginina. El aminoácido captado por el fotobionte (Fig. 14) incrementa su concentración intracelular. Sin embargo, dado que el descenso de la arginina exógena parece más alto que el incremento del aminoácido en el fotobionte, es posible que la arginina sea catabolizada exógenamente por una arginina descarboxilasa segregable al medio (Vicente y Legaz, 1983). En presencia del suplemento del aminoácido y en ausencia de actividad ureasa en pared, la lectina intratalina puede incorporarse al citoplasma del fotobionte. Este hecho, provoca una fuerte pérdida de las condiciones fotoergónicas por disminución en la concentración de clorofilas. Este efecto, no se observa ni en fotobiontes recién aislados previamente inducidos con urea, es decir, con ureasa en pared, ni en los fotobiontes control (Fig. 15). Por otra parte, sólo se observó citoaglutinación cuando los fotobiontes contenían ureasa en su pared, lo que confirma que sólo en estos casos se une la lectina intratalina (Fig. 16). Esta capacidad aglutinante de las arginasas glicosiladas se confirmó con eritrocitos humanos del grupo B (Fig. 17), aunque parece que la reacción de hemaglutinación es negativa frente a eritrocitos humanos, de oveja y de conejo de los grupos A y O (Galun *et al.*, 1984). Algunos autores (Lockhart *et al.*, 1978; Ingram, 1982; Andrews, 1992) han confirmado la capacidad eritroaglutinante de ciertas lectinas o extractos líquénicos. Sin embargo, esto no significa que exista especificidad en el reconocimiento de eritrocitos compatibles, al menos esta suposición no tiene importancia fisiológica alguna. Estos resultados deben interpretarse como especificidad o inespecificidad de las lectinas frente a carbohidratos o glicoproteínas antigénicas determinadas (Ingram,

1982). De igual forma, la capacidad de unión de la lectina con actividad arginasa del líquen *X. parietina* a diferentes fotobiontes va a depender de la naturaleza de los receptores de pared y no de la compatibilidad de los fotobiontes en los primeros estadios de la resíntesis entendida como adecuación de dos distintas velocidades de transformaciones metabólicas (Ahmadjian, 1987) o posibilidad de adherirse a cuerpos físicos vivos o inertes (Ahmadjian, 1993). En este sentido, el micobionte no puede reconocer a los eritrocitos como células compatibles y sin embargo, esta lectina sintetizada por el micobionte es capaz de unirse a glóbulos rojos humanos (Fig. 17).

La pérdida de las condiciones fotoenergéticas como consecuencia de la entrada de arginina exógena y de la penetración de lectina en los fotobiontes está estrechamente relacionada con las observaciones en talos de *X. parietina* sometidas a tratamientos similares. Los talos de este líquen presentan la ultraestructura que se observa en la Fig. 22 y 23, formados por un ascomicete y fotobiontes trebouxoides que mantienen el equilibrio en simbiosis, observándose en algunas ocasiones haustorios intraparietales. La incorporación de arginina al talo provoca alteraciones estructurales a nivel citoplásmico con el consiguiente colapso de los biontes (Fig. 24) probablemente como consecuencia de la hidrólisis de este aminoácido y el aumento en la concentración de poliaminas (Legaz, 1985; Legaz, 1991) que provocan un efecto tóxico. Este efecto incrementa cuando el receptor de pared no ha sido inducido y la lectina parcialmente purificada, con actividad arginasa, es capaz de incorporarse a los fotobiontes. En este caso, el equilibrio entre los simbiontes se rompe provocando alteraciones que se traducen en el aumento de haustorios intracelulares y, en último término, en la rotura de pared de los biontes con la consiguiente muerte celular (Figs. 28 y 29). El desarrollo de haustorios intracelulares solamente se ha descrito en *X. parietina* en los primeros estadios de la resíntesis (Bubrick y Galun, 1986), posiblemente como consecuencia de la virulencia del hongo cuyo comportamiento en este punto puede considerarse patógeno (Ahmadjian, 1987). En este caso, los xenohabitantes de la simbiosis, que se calculan en varios millones por gramo de talo (Lenova y Blum, 1983) y que en condiciones normales

mantienen regulado su desarrollo, disparan su crecimiento como consecuencia de la ruptura del equilibrio simbiótico o quizás por estar implicados en él directamente. Dado que algunas bacterias xenohabitanes tienen actividad antimicrobiana (Zook, 1983), cabe pensar que la pérdida del equilibrio entre los asociados pueda afectar a esta capacidad defensiva de forma que diferentes colonias contaminan el ensayo (Fig. 28).

La consecuencia última de la incubación del fotobionte con lectina del micobionte durante un tiempo prolongado es la muerte de los fotobiontes y, como resultado, la muerte del micobionte, tal como ocurre en las relaciones parasitarias virulentas. Sin embargo, en presencia del receptor de pared, los talos mantienen el equilibrio (Fig. 27), aunque se observan modificaciones ultraestructurales posiblemente como consecuencia de la incubación con urea (Fig. 25 y 26). Puesto que la incubación con urea durante 2h no provocaba fuertes alteraciones estructurales en simbiosis, se comprobó a nivel ultraestructural qué ocurriría si los fotobiontes aislados fueran incubados durante el tiempo y la concentración óptima descrita para obtener el máximo de actividad específica en paredes del fotobionte, es decir, incubación de fotobiontes en urea 100 mM durante 4 h (Fig. 6.B.). Las observaciones al microscopio electrónico de barrido no presentaron diferencias significativas entre la superficie de las algas incubadas en urea y las no tratadas (Fig. 30). Las observaciones por transmisión confirmaron los resultados anteriores aunque se observó cierta proteólisis en ambos tratamientos posiblemente consecuencia del proceso drástico de extracción de la algas (Fig. 31 y 32). Conviene resaltar, no obstante, que en los fotobiontes incubados con urea 100 mM durante 4 h se observa la disposición elipsoidal de los tilacoides, observada en el talo incubado en urea 100 mM durante 2h (Fig. 25 y 26).

La incubación de los fotobiontes en estas nuevas condiciones de inducción con la lectina purificada hasta homogeneidad (Tabla 6) y marcada con fluorescencia supone un aumento en el número de fotobiontes con fluorescencia amarilla del 30% (tras incubación con urea 2h, Tabla 5) hasta un 77% (Tabla 11, Fig. 48). Por tanto, la purificación total de la proteína así como la incubación de los

fotobiontes en las condiciones óptimas de detección de actividad ureasa en pared suponen un aumento en el número de fotobiontes capaces de unir a su pared la lectina fúngica. Este incremento puede explicarse porque, en estas condiciones, un mayor número de células son capaces de secretar ureasa al medio, y, por tanto, de presentarla en su pared y además porque la purificación de ABP evita interacciones proteína-proteína que pueden dificultar la unión al receptor (Pedrosa y Legaz, 1991b).

La purificación de arginasa intratalina (ABP) se llevó a cabo mediante técnicas convencionales de precipitación y separación por exclusión molecular e intercambiadores iónicos (Fig. 33 y 34), tradicionalmente aceptadas para la purificación de lectinas (Petrescu *et al.*, 1993; Yagi *et al.*, 1994; Hoedemaeker *et al.*, 1994). La determinación de la naturaleza segregable de esta proteína se realizó por purificación de la arginasa segregable (SA), (Fig.36 y 37, Tabla 7) y posterior caracterización y comparación de ambas proteínas. Las condiciones óptimas para obtener un mayor rendimiento de purificación del medio de secreción fueron 1h de incubación en arginina 40 mM en oscuridad a 26°C (Fig. 35). Estos resultados difieren de los obtenidos para otras arginasas segregables líquénicas tales como la purificada de *E. prunastri* cuyo óptimo de secreción fue de 8h en oscuridad en la misma concentración de arginina (Planelles y Legaz, 1987).

Conviene resaltar el comportamiento de elución de estas proteínas por Sephadex, especialmente en el caso de la ABP (Fig. 34), puesto que se producen agregados que llegan a eluir en el volumen muerto. La formación de oligómeros durante los procesos de purificación de lectinas (Shannon y Hankins, 1981) y de arginasas (Ikamoto *et al.*, 1991) así como en disolución (Gupta y Brewer, 1994) han sido descritos aunque algunos autores no han detectado este comportamiento (Sankaramayanan *et al.*, 1993).

Ambas proteínas, ABP y SA, se comportaban como hemaglutininas frente a glóbulos rojos humanos del grupo B (Fig. 17 y 54), así como frente a fotobiontes (Fig. 16), y por tanto, nos permitió

verificar su naturaleza como lectinas. La actividad arginasa desarrollada por ambas proteínas nos permitió establecer que eran dos isoformas de arginasa.

El concepto de isolectina ha surgido fundamentalmente como consecuencia de los resultados obtenidos tras aplicar las técnicas de purificación en lectinas surgiendo en los últimos pasos de purificación heterogeneidad proteica. Tras establecer que no se trataba de contaminantes, se denominaron isolectinas. Aunque no existe una definición establecida, los últimos trabajos de purificación y caracterización de lectinas consideran que dos proteínas son isolectinas tras comprobar su naturaleza glicosilada con capacidad para unirse a oligosacáridos o proteínas glicosídica (Yoshida *et al.*, 1994) y establecer una alta homología en su composición aminoacídica, probablemente como consecuencia de la diferenciación de un gen ancestral común (Chrispells y Raikhel, 1991). Con frecuencia pueden tener especificidad en la unión a carbohidratos y compartir el mismo resto glicosídico (Yamaguchi *et al.*, 1993), aunque, existen isolectinas que no tienen una especificidad idéntica frente a distintos carbohidratos (Yagi *et al.*, 1994) pudiendo existir modificaciones en la composición de restos glicosídicos así como en el número de cadenas (Yamaguchi *et al.*, 1993). Aunque la definición de isolectina es muy extensa, la homología en la composición de aminoácidos es fundamental para determinar si dos lectinas son isolectinas. Wantyghem *et al.* (1992) describen dos lectinas con el mismo resto glicosídico; sin embargo, al no establecer la composición de aminoácidos estas proteínas se consideran lectinas. Mandal *et al.* (1994), tras determinar la homología aminoacídica así como la especificidad en la unión a D-galactosa y N-Acetil-D-galactosamina de tres lectinas, sugieren que son isolectinas a pesar de no determinar la composición del resto carbohidratado. La homología en la secuencia de aminoácidos tampoco es necesaria (Yagi *et al.*, 1994; Mandal *et al.*, 1994). Por otra parte, las técnicas utilizadas en la purificación así como la localización en el organismo o individuo no se consideran como determinantes en la discriminación de este tipo de lectinas (Bortwick, 1992; Hoedemaeker *et al.*, 1994).

En general, la caracterización de las lectinas conlleva el estudio de estas proteínas a distintos niveles bioquímicos. El punto isoelectrico (pI) suele ser uno de los parámetros analizados. Mandan *et al.* (1994) describe puntos isoelectricos de 7,0, 6,85 y 6,7 para tres isolectinas de soja considerando la diferencia en los puntos isoelectricos como consecuencia de la presencia de un aminoácido ácido en la última isolectina que no aparece en la primera. Sin embargo, es frecuente que las lectinas vegetales tomen valores de punto isoelectrico ácido (Yagi *et al.*, 1990; Yagi *et al.*, 1994). En general, la determinación del pI se ha realizado tradicionalmente mediante isoelectroenfoque en gradiente de pH. Pedrosa (1993) determinan el pI de distintas isoformas de arginasa mediante electroforesis capilar zonal e isoelectroenfoque comparando ambos resultados. La arginasa segregable purificada de *E. prunastri* presenta un valor de pI 3,8 o 5,7 dependiendo de la ausencia o presencia de espermidina 0,5 mM como regulador del flujo electrosmótico favoreciendo de este modo la determinación correcta del pI. Las lectinas de *X. parietina* tienen un pI de 3,7 (ABP) y 4,7 (SA) por electroforesis capilar zonal (Fig. 38). Estos datos están relacionados con los obtenidos para otras isolectinas vegetales (Yagi *et al.*, 1994). Sin embargo, hay que considerar la conveniencia de determinar el pI en presencia de espermidina 0,5 mM. En cualquier caso, los datos nos permiten establecer la naturaleza acídica de ambas proteínas (Fig. 38).

El peso molecular de ambas arginasas fue determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida. La electroforesis desnaturizante en SDS al 0,1% resolvió ambas proteínas en una única banda anódica, es decir, como proteínas acídicas, (Fig. 39) de forma similar a lo descrito para otras arginasas de líquenes (Legaz, 1991). El peso molecular estimado fue de 58,6 kDa. Cuando se realizó electroforesis convencional nativa en un gel de poliacrilamida al 12%, la proteína no se resolvió probablemente por la formación de polímeros o agregados de alto peso molecular, muy frecuentes en las preparaciones de lectinas (Gupta y Brewer, 1994; Mandal y Brewer, 1992). La Fig. 34 muestra los diferentes estados de agregación de la ABP por filtración en Sephadex descrito también para otras

arginasas (Ikamoto *et al.*, 1990) observandose, además, una disminución en la actividad arginasa según se forman agregados de mayor peso molecular. La pérdida de actividad en paralelo al aumento de la masa molecular ha sido también descrita para otras enzimas de líquenes (Vicente y Legaz, 1988). Mo *et al.* (1993), describen la autoagregación de una lectina monomérica de 11 kDa de forma que en disolución, existe como una mezcla monomérica y oligomérica, modificando esta asociación su respuesta frente a distintos carbohidratos. En este sentido, Yagi *et al.* (1994) y Kamemura *et al.* (1993) reducen la concentración del gel hasta un 7,5% de poliacrilamida con objeto de permitir la entrada del agregado en el gel. Por otra parte, las isolectinas pueden tener el mismo peso molecular (Yagi *et al.*, 1993) o diferente (Yamaguchi *et al.*, 1993, Yagi *et al.*, 1994).

El análisis de aminoácidos revela que ambas proteínas tienen la misma composición desde el punto de vista cuantitativo y una alta homología en el porcentaje de aminoácidos. La Tabla 8 muestra un elevado porcentaje de aminoácidos ácidos y polares, siendo el aminoácido más frecuente la Gly en ambas proteínas. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos para otras lectinas vegetales (Yagi *et al.*, 1994; Mo *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1994, Yagi *et al.*, 1993) e incluso animales (Boucias y Pendland, 1993) apareciendo en algunos casos, poco frecuentes, un elevado porcentaje de Cys (Petrescu *et al.*, 1993; Hernández *et al.*, 1993) aunque este elevado porcentaje de aminoácidos polares y ácidos no siempre se mantiene (Kamemura *et al.*, 1993; Yamashita *et al.*, 1992). Algunas isoformas de arginasa aisladas y purificadas del líquen *X. parietina* mantienen la misma frecuencia relativa en sus aminoácidos (Pedrosa, 1993).

El análisis de aminoácidos que constituyen el resto glicosilado se llevó a cabo en las isoformas de arginasa mediante hidrólisis ácida y posterior análisis por HPLC. El uso de un detector ultravioleta como el Spectra System UV 2000, de 6 a 10 veces más sensible que otros detectores previamente utilizados (por ejemplo VariChrom TM UV-Vis/10, Vicente *et al.*, 1991) reveló la presencia de sustancias contaminantes en los patrones. Algunos de ellos, tales como glucosa, galactosa y

glucosamina presentaban contaminantes, probablemente productos de degradación (Fig. 41 A y Fig. 42. A). Por tanto, se necesitó un proceso de prepurificación de los patrones para eliminar las contaminaciones, proceso que se llevó a cabo por filtración a través de alumnina neutra (Fig. 40). Cuando fue posible, la fracción de la columna con mayor concentración de azúcar se analizó con enzimas específicas. La identidad de la glucosa y galactosa se confirmó por reacción con glucosa oxidasa (Raabo *et al.*, 1960) o galactosa oxidasa (Avigad *et al.*, 1962).

Por otra parte, el pico de los patrones después de la filtración coincidía con uno de los picos de las sustancias no filtradas. El método para el análisis es altamente sensible, exacto y repetitivo (Vicente *et al.*, 1991), tal como demuestran los resultados obtenidos al analizar los azúcares de la fetuina, una glicoproteína cuya composición cualitativa y cuantitativa del resto carbonado se conocía previamente (Spiro, 1960; Spiro *et al.*, 1977). Ambas isoelectinas presentaban claras diferencias en uno de los componentes del resto carbonado (Fig. 43 y 44). La isoelectina segregable (SA), contenía D-galactosa y D-glucosa (Fig. 44) mientras que la isoelectina intratalina (ABP) mostró un oligosacárido de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina (Fig. 43) como resto carbohidrato. La presencia de N-acetil-D-glucosamina podría explicar la diferencias en el pI, dado que la ABP tiene un punto isoelectrico aparentemente menor y contiene un monosacárido ácido como la N-acetil-D-glucosamina. Por otra parte, la arginasa segregable de *X. parietina* es bastante diferente de la purificada de otros líquenes. En *E. prunastri* el resto carbohidrato está compuesto por glucosa, fructosa y manosa (Planelles y Legaz, 1987).

Con frecuencia, la composición de azúcares del resto glicosídico ha sido analizada por cromatografía de afinidad (Crowley y Goldstein, 1981) o por digestión con enzimas específicas (Kilpatrick *et al.*, 1978). De esta forma, se ha descrito que la lectina de semillas de *Datura stramonium* tiene un resto glicosídico que constituye el 37% de su peso y que su composición es un 93% de arabinosa y un 7% de galactosa (Desai *et al.*, 1981; Crowley y Goldstein, 1981). Otros oligosacáridos

en plantas se han determinado por intercambio iónico (Nagel y Wilson, 1969) o cromatografía de gases, utilizando esta técnica fundamentalmente en los últimos años (Raymond y Nagel, 1969; Wantygen *et al.*, 1992; Debray *et al.*, 1992; Yamaguchi *et al.*, 1993). Aunque se pueden obtener buenos resultados con estas técnicas, la preparación de las muestras y la analítica suele ser tediosa y por otra parte se necesita aproximadamente 1 mg de proteína pura. A la sensibilidad y rapidez de la técnica de HPLC (no más de 10 minutos de análisis, Fig. 40 y 41, Tabla 9) se une la baja cantidad de proteína necesaria para su análisis 4-5 mg. Los espectros de fluorescencia (Fig. 46) de ABP y SA se obtuvieron sobre la base de la fluorescencia natural de los anillos aromáticos de algunos aminoácidos y muestran nuevamente una alta homología en la composición de aminoácidos puesto que las señales de fluorescencia que emiten las proteínas cuando se excitan a 257 nm son muy similares. Los máximos de fluorescencia a aproximadamente 320 nm indican presencia de Tryp y a aproximadamente 350 nm, de Tyr. El "hombro" observado a 300 nm revela Phe. El desplazamiento del máximo de emisión de 347,5 nm de ABP hacia el rojo (357,5 nm) en SA indica una esternalización de los restos Tyr en la estructura terciaria de SA, quedando más descubiertos en la zona polar de la proteína, lo que aumenta su interacción con el disolvente. El "hombro" a 445 nm indica cercanía de dos fluoróforos (Tryp) en la estructura tridimensional (Campbell, 1984).

Los resultados obtenidos nos permiten confirmar que ambas lectinas son diferentes y que pueden ser consideradas como isolectinas, así como isoformas de arginasa (Griffiths y Black, 1987).

Numerosos trabajo de purificación y caracterización de lectinas vegetales se han realizado en los últimos años, como veíamos anteriormente. Sin embargo, poco se sabe de la funcionalidad y de la importancia fisiológica de las isolectinas. Nagai y Yamaguchi, (1993) y Nagai *et al.*, (1993) sugieren que la cadena carbonatda tiene una gran importancia en el ensamblaje y plegamiento intramolecular de las lectinas, describiendo que proteínas no glicosiladas pierden su actividad aglutinante. Debray *et al.*, (1992) muestra como una de las cadenas carbonadas de una lectina de *Viscum album* está directamente

implicada en la unión al receptor, mientras la otra determina la toxicidad de la proteína. Kamemura *et al.*, (1993) purifican y caracteriza dos isolectinas, una de ellas GNL-1, tiene un fuerte efecto mitógeno mientras que GNL-2, pierde esta capacidad.

La importancia fisiológica de esta isolectinas (ABP y SA) se planteó en relación con los datos previamente obtenidos para la lectina intratalina parcialmente purificada y que han sido discutidos anteriormente, así como en función de su actividad arginasa. Una diferencia sustancial entre ambas proteínas que pudiera tener importancia fisiológica es la afinidad diferencial frente a un mismo receptor de pared. La idea de que el mismo receptor es compartido por las dos isolectinas se apoya en la pérdida total de la actividad enzimática del receptor cuando se unen la isolectinas, tanto ABP como SA (Figs. 55 y 65 en fotobiontes y cultivos respectivamente) como la lectina parcialmente pura (Tabla 3). La unión de la isolectinas es diferencial tal como se describe para otras lectinas vegetales frente a diferentes carbohidratos y proteínas (Mo *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1994). La unión de SA al receptor de pared es más fuerte que la observada para ABP, dado que SA fácilmente desplaza a ABP de la pared celular del fotobionte mientras que la capacidad de desplazamiento de ABP hacia SA una vez unida al receptor es menor, como se observa por fluorimetría (Lockhart *et al.*, 1978), (Tabla 10). Estos resultados se confirman mediante observación microscópica, dado que la unión de ABP marcada es de 76,9% mientras con SA marcada es de 88% aproximadamente. Las reacciones cruzadas revelan una alta capacidad de desplazamiento por parte de la SA (81,3%) y muy baja para la ABP (25%). La unión de las isoformas de arginasa modifican la actividad enzimática del receptor anulándola totalmente (Fig. 54), pero no el sitio de unión, puesto que no existen diferencias significativas entre el porcentaje de fluorescencia obtenido cuando se une la SA marcada directamente o después de la unión de ABP. Posibles modificaciones podrían ocurrir tras la unión de SA (Tabla 11 y 12). El cambio de N-acetil-D-glucosamina por galactosa puede explicar la mayor afinidad del receptor hacia la SA. La unión podría ser similar a la adhesión de *Bradyrhizobium japonicum* a la raíz de soja a través de una proteína de

pared de peso molecular 39 kDa (Ho *et al.*, 1990), específica de galactosa (Smith y Wollum, 1993). Muchos, son los ejemplos de especificidad a homopolímeros o heterómeros de galactosa en el reino vegetal (Hicha *et al.*, 1993; Yamaguchi *et al.*, 1993; Mo *et al.*, 1994) e incluso Boucias y Pendland, (1993) purifican una glicoproteína específica de galactosa de *Spodoptera exigua*. En este caso, de la ureasa glicosilada de pared, parece que tiene una mayor afinidad hacia un heterómero de galactosa (glucosa+galactosa) que hacia un heterómero de N-acetil-glucosamina (glucosa+N-acetil-glucosamina).

Por otra parte, cuando las isolectinas penetran en el interior del fotobionte, posiblemente por endocitosis (Jonas *et al.*, 1992), se produce un aumento de la concentración de putrescina libre, en presencia de arginina, aumento que no se observa ni en el control ni en las células que presentaban el receptor en pared (Fig. 50). Incluso la entrada de SA provoca un aumento considerable de putrescina conjugada a macromoléculas insolubles en agua (Fig. 51). Por otra parte, variaciones en el nivel de espermidina se observan en la fracción SH en todos los tratamientos respecto al control que no parecen depender de la presencia o ausencia de ABP o SA (Fig. 52). Sorprendentemente, la PH-putrescina parece ser dependiente del suplemento de arginina además de la propia capacidad enzimática de las isolectinas, mientras que el incremento de PH-espermidina parece depender de urea (Fig. 51). Guarino y Cohen (1979 a y b) encuentran que un incremento en la cantidad de putrescina causa la muerte de cianobacterias. Vicente y Legaz (1983) describen un rápido blanqueamiento de los talos al adicionar putrescina al medio de cultivo. Cheng *et al.* (1984) describen una activación en la degradación de clorofilas por poliaminas en hojas cortadas de arroz. La acumulación de poliaminas también causa la muerte de células animales en cultivo (Mitchell *et al.*, 1992; Parchment, 1993). David y Ristow (1989, 1991) describen la inhibición del crecimiento de *N. grassa* por poliaminas. Sin embargo, existen numerosos artículos que describen como las poliaminas previenen la senescencia (Birecka *et al.* 1991; Evans y Malmberg, 1989; Slocum *et al.*, 1984) y organizan el cloroplasto (Besford *et al.*, 1993) en plantas superiores. En la hepática *Marchantia polymorpha* se observa un aumento concomitante de la

concentración de putrescina y de clorofila (Stanislaus y Maravolo, 1994). La valoración de clorofilas endógena tras los tratamientos descritos en fotobiontes de *X. parietina* no reveló la aparición de productos de degradación ni un aumento en la actividad clorofilasa consecuencia de la entrada de las isolectinas y del aumento de putrescina (Fig. 53).

No existen muchos trabajos que establezcan una correlación directa entre el incremento en la concentración de putrescina y modificaciones a nivel estructural. Sin embargo, el efecto más inmediato observado cuando ABP penetraba en los fotobiontes que fue la disminución de la concentración de clorofilas (Fig. 15), puede relacionarse con la rotura de paredes del fotobionte en los talos (Fig. 28 y 29). Estos resultados se confirmaron con las isolectinas puras cuando éstas fueron incubadas con fotobiontes no inducidos (Figs. 56.D, E, F y 57.D, E y F) frente a fotobiontes inducidos (Fig. 56.C y 57.C) y a los controles (Fig. 56.A, B y 57.A y B). La rotura de paredes iba seguida por la pérdida del contenido citoplasmático, formación de fantasmas y, como consecuencia, disminución de la concentración de clorofilas e incluso degradación posterior de la misma. Por otra parte, la valoración de actividad glucanasa reveló un aumento en la actividad de esta enzima a nivel intracelular concomitante con el aumento de putrescina consecuencia de la entrada de las isolectinas que no se observó en presencia del receptor específico de pared (Fig. 58). La urea no produjo ningún efecto activador en la glucanasa. El efecto de la putrescina parece inhibitorio a bajas concentraciones, desinhibiéndose la actividad enzimática al aumentar la concentración. Resultados previamente descritos demuestran que la putrescina puede activar enzimas degradativas (Escribano y Legaz, 1985). Otra explicación posible sería la síntesis *de novo* de glucanasa aunque los resultados con glucanasa comercial y extractos celulares soportan más la primera hipótesis (Fig. 59).

En relación con esta teoría, Escribano y Legaz, (1988) publicaron que el porcentaje de putrescina libre en fotobiontes de *E. prunastri* era muy bajo (0,62% del total). Esta pequeña cantidad de putrescina sería sintetizada en condiciones normales a partir de arginina a pH neutro por

descarboxilación del aminoácido por una arginina descarboxilada localizada preferentemente en el alga (Legaz y Vicente, 1981). Sin embargo, la putrescina del hongo es secuencialmente producida a pH alcalino por una arginasa y una ornitina descarboxilasa, la cual se localiza fundamentalmente en el patrón fúngico (Legaz, 1985, 1991). El aporte de arginina exógena puede mimetizar una situación en la cual una parte del aminoácido que contiene el talo liquénico (Legaz *et al.*, 1986) pueda entrar en las algas después de su rehidratación. Efectivamente, el fotobionte de *X. parietina* triplica el contenido de arginina después de incubarse en arginina 28 mM (Fig. 14). Esta cantidad de arginina puede incrementar en si misma la cantidad de putrescina, aunque sea lentamente descarboxilada por la arginina descarboxilasa del fotobionte. Sin embargo, puede ser rápidamente hidrolizada por distintas isoformas de arginasa, dado que la afinidad por el sustrato es 60 veces superior para la arginasa que para la descarboxilasa (Planelles y Legaz, 1987; Vicente y Legaz, 1981). Esto solamente puede ocurrir cuando el receptor de pared no está presente, es decir, cuando no se detecta actividad ureasa en pared como demostramos anteriormente.

Por tanto, las isolectinas purificadas del liquen *X. parietina* deben ser isoformas de arginasa de origen fúngico. Estas glicoproteínas son capaces de incrementar el nivel de putrescina libre y conjugada a macromoléculas insolubles en agua cuando penetran en el fotobionte. Es decir, no son retenidas en pared por presencia de un receptor específico con actividad ureasa. Como consecuencia, se observan alteraciones estructurales que finalizan con la rotura de pared del fotobionte y el desequilibrio en la simbiosis, acontecimientos que están correlacionados con el aumento en la actividad glucanasa. Estos resultados están de acuerdo con la correlación bien conocida entre la putrescina y la infectividad fúngica (Rajam *et al.*, 1985; West y Walter, 1988; 1989).

En relación con la capacidad de unión de la lectinas sintetizadas por el micobionte al fotobionte, Bubrick y Galun (1980) y Marx y Peveling (1983) proponen la necesidad de que los fotobiontes hayan sido aislados y cultivados aposimbióticamente en cultivo axénico. El aislamiento y cultivo del fotobionte

en estas condicioens (Stocker-Wörgötten y Türk, 1989) permiten la obtención de una población heterogenea sin contaminaciones (Figs. 61-64) con un gran número de aplanosporangios y autosporas (Fig. 63 y 64). Este comportamiento de división y desarrollo de las algas aisladas es completamente diferente a las observaciones en talo completo donde rara vez se observaron aplanosporangios (Fig. 11) y donde el tamaño de la población estaba fundamentalmente formada por células de pequeño tamaño (10-200 μm^2 , Fig. 12). Esta diferencia puede explicarse como consecuencia de la presencia del fotobionte (Honegger, 1991) debido al efecto ficocida de los fenoles (Avalos y Vicente, 1987) o quizás a la actividad arginasa de estas isoelectinas que conducen al deterioro y muerte de las células que no presentan receptores en pared. La presencia de estos receptores va a depender del estado fisiológico de las células, como se apuntaba anteriormente (Marx y Peveling, 1983; Kardish *et al.*, 1991), así como a las condiciones de ensayo. Por ejemplo, una mayor o menor concentración de urea que puede mimetizar condiciones ambientales, dado que este hecho depende de condiciones externas, como el sustrato donde se desarrolla el liquen, rehidratación, etc (Rodriguez y Vicente, 1991). Igualmente, la presencia de urea en los talos va a depender de los propios mecanismos internos de regulación metabólica de la ureasa (Legaz y Vicente, 1989). Los fotobiontes en cultivo y división mostraron la presencia de algas del género *Trebouxia* en división vegetativa (Fig. 62, 63 y 64) y del género *Pseudotrebouxia* (Fig. 64) en división no vegetativa de acuerdo con Ahmadjian, (1982). Los trebouxoides que no fueron incubados en urea previamente presentaron rotura de paredes 30 min después de la incubación con la isoelectina-arginasa segregable (Fig. 66-68), formándose protoplastos y fantasmas y observándose una clara pérdida del contenido citoplasmático al medio de cultivo. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos en fotobiontes recién aislados al incubarlos con SA (Fig. 57). Sin embargo, en este caso el número de células dañadas es mayor y el tiempo de incubación necesario para observar los primeros daños se reduce considerablemente, de 5h en el caso de los fotobiontes recién aislados a 30 min para los trebouxoides en cultivo. Las observaciones al microscopio electrónico

de los talos con un tratamiento similar revelaron que estos daños se observaron 18h después del tratamiento con lectina intratalina (Figs. 28 y 29). Estos resultados están de acuerdo con las teorías de coevolución y virulencia del micobionte en *X. parietina*, expuestas por Ahmadjian (1987), puesto que el primer contacto entre los biontes puede conducir a la muerte celular si estas células no son capaces de desarrollar el receptor específico en pared. Cuando los trebouxoides presentaron ureasa en pared las células no mostraron daños aparentes tal como ocurre con fotobiontes recién aislados (Fig. 69-71). Igualmente, la unión de la SA y su receptor inhibe la actividad ureasa en pared tal como ocurría con fotobiontes aislados e inducidos (Fig. 55). En los casos en que la células fueron dañadas, no se observó actividad ureasa en pared (Fig. 65). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Stocker-Wörgötten y Türk (1989), puesto que los intentos de resíntesis con biontes de *X. parietina* sólo llegaron a los primeros estados de pre-escumula a partir del cual la resíntesis abortaba. En contraste con lo descrito por Bubrick y Galun (1980), sólo se observó fluorescencia amarillo-verdosa consecuencia de la unión de las isolectinas marcadas cuando los cultivos se incubaron con urea (Tabla 13) y por tanto, tenían ureasa en pared (Fig. 65). Cuando las glicoproteínas eran susceptibles de penetrar en la célula se observaba cierta fluorescencia amarilla-verdosa posiblemente consecuencia de las alteraciones moleculares provocadas por las isolectinas de arginasa (Kauppi, 1980; Holopainen y Kauppi, 1989). Por otra parte, la presencia en cultivo de EDTA no parece favorecer la unión de ABP marcada, es decir, estas isolectinas no dependerían de iones metálicos (Bubrick *et al.*, 1985). La presencia de urea 8 M durante 1 h en los cultivos (Bubrick *et al.*, 1985) no favorece la unión de la lectina fúngica posiblemente porque estas concentraciones son extremadamente altas y pueden ser tóxicas o inhibir la secreción de urea.

Por tanto, los resultados revelan que los cultivos de trebouxoides de *X. parietina* de dos meses no presentan el receptor de pared si no son inducidos en urea previamente. Además, los efectos de ABP o SA son más drásticos y tóxico sobre fotobiontes en cultivo que sobre fotobiontes recién aislados o en

talo. El marcado desarrollo celular y el elevado número de células en división en cultivo aposimbiótico frente a endosimbiontes es una evidencia más del fuerte control del componente fúngico sobre el autobionte.

CONCLUSIONES

Los resultados anteriormente expuestos, permiten llegar a una serie de conclusiones que, junto con la información bibliográfica precedente, permiten elaborar una teoría que explique la importancia fisiológica de estas isoelectinas en la simbiosis líquénica y en resíntesis o reproducción sexual. Las conclusiones principales en que se apoya dicha teoría se indica a continuación:

- 1.- El líquen *X. parietina* es capaz de sintetizar diferentes isoformas de arginasa constitutivas, una de ellas glicosilada y la otra no glicosídica.
- 2.- Dos proteínas glicosiladas con actividad arginasa han sido descritas como isoelectinas dada su alta homología en la composición aminoacídica y su acción hemaglutinante y ficoaglutinante. Ambas proteínas de naturaleza ácida tienen un peso molecular de 58,6 kDa. Sin embargo, la composición del resto glicosídico es diferente. La arginasa segregable (SA), muestra 16 restos de D-glucosa y 16 restos de N-Acetil-D-glucosamina. La arginasa intratalina (ABP) muestra 11 restos de D-galactosa y 27 restos de D-glucosa.
- 3.- Ambas proteínas son de naturaleza fúngica y tienen distinta localización en el talo: ABP está localizada en la pared del hongo mientras que SA es segregada al medio.
- 4.- El alga que constituye el autóbionte de la simbiosis es capaz de segregar ureasa en presencia de urea y retener esta actividad en pared.
- 5.- El inductor no provoca daños estructurales ni a nivel óptico ni electrónico.
- 6.- Esta proteína glicosilada con actividad ureasa es capaz de actuar como receptor de ambas isoelectinas.
- 7.- Una de las isoelectinas, ABP, descrita tradicionalmente como una molécula de reconocimiento es capaz de unirse a fotobiontes alejados filogenéticamente del endosimbionte propio, si éstos han sido inducidos con urea.

- 8.- Ambas lectinas tienen diferente afinidad por el receptor, teniendo SA una mayor capacidad de desplazamiento sobre ABP que en el caso inverso.
- 9.- El fotobionte es susceptible de absorber arginina del medio, triplicando la concentración endógena de este aminoácido.
- 10.- ABP y SA pueden entrar en el fotobionte activando la ruta de hidrólisis de arginina y síntesis de poliaminas. De hecho, como resultado de la entrada de SA se produce un aumento de putrescina libre y conjugada a macromoléculas insolubles en agua y la entrada de ABP conlleva un aumento de putrescina libre
- 11.- El incremento en la concentración de esta poliamina favorece la actuación de enzimas degradativas, tales como glucanasas pero no de clorofilasa.
- 12.- Las observaciones a nivel celular, como resultado de estas modificaciones metabólicas, son:
 - 12.1. Desequilibrios en la simbiosis como consecuencia de la rotura de paredes, desarrollo de haustorios intracelulares e infectividad bacteriana después de 18 horas de tratamiento.
 - 12.2. Rotura de paredes del fotobionte y pérdida del contenido citoplasmático después de 5 horas de tratamiento.
 - 12.3. El mismo efecto se observa en fotobiontes cultivados pero sólo con 30 minutos de incubación.
- 13.- La retención de las isolectinas en pared como consecuencia de la unión al receptor enzimático anula estos efectos.
- 14.- Cultivos del fotobionte aislado de *X. parietina* en condiciones axénicas durante dos meses no es condición suficiente para la unión de las isolectinas. Es necesaria la inducción del receptor con urea.

15.-Marcado desarrollo y elevado número de células en división en cultivo aposimbionte asincrónico frente a endosimbiontes recién aislados como consecuencia del fuerte control del componente fúngico.

TEORÍA

La presencia de un único receptor en la pared algal y dos isolectinas fúngicas puede explicar un **mecanismo molecular de defensa-ataque atenuado**.

Puesto que ABP es una proteína que no se segrega al medio, desde el punto de vista fisiológico no provocaría alteraciones metabólicas o estructurales consecuencia de la entrada de la proteína en el fotobionte, por tanto, estaría unida a su receptor dependiendo de las condiciones ambientales, metabólicas y fisiológicas (Marx y Peveling, 1983, Kardish *et al.*, 1991, Rodríguez y Vicente, 1991).

La hipotética existencia de dos receptores específicos para cada isolectina reduciría la interrelación a nivel de estos receptores a dos posibles situaciones:

- 1.-La secreción de SA en presencia del receptor. En este caso la glicoproteína quedaría retenida en pared de manera que la capacidad infectiva del hongo se reduciría totalmente.
- 2.-La secreción de SA en ausencia del receptor. Como consecuencia, todas las moléculas segregadas serían capaces de penetrar provocando daños metabólicos y estructurales irreversibles similares a los observados experimentalmente. En este caso, la situación se asemejaría a una interacción entre un patógeno virulento y su huésped.

Considerando la "vocación" parasitaria del componente fúngico, la presencia de un sólo receptor en pared capaz de unirse a dos isolectinas con actividad arginasa puede haber sido una combinación favorecida por la selección natural en los procesos de coevolución de los simbioses. Analizaremos la situación desde dos puntos de vista.

1.-Estado simbiótico

En el talo líquénico el hongo y el alga están íntimamente unidos (Honegger, 1991) por lo que ABP podría estar unida al receptor dependiendo de la presencia o no de este último en la pared del alga. Tal como exponíamos en el caso hipotético anterior, esto depende de condiciones ambientales, metabólicas y fisiológicas. La secreción de arginasa al medio intercelular, dependiendo del estado de hidratación y concentración de arginina en talo (Legaz *et al.*, 1986),

podría conducir a la muerte del fotobionte si esta isolectina no fuera retenida en pared. En este caso, el comportamiento del micobionte sería virulento. Si el receptor estuviera en pared, muy posiblemente estaría bloqueado por ABP de tal manera que si SA no fuera capaz de unirse a este receptor, la situación sería similar a las anteriores: es decir, todas las moléculas de SA entrarían en el fotobionte. Sin embargo, SA tiene una alta afinidad por el receptor desplazando la mayor parte de las moléculas de ABP. Se trataría, por tanto, de un mecanismo de defensa por parte del alga. No obstante, no todas las moléculas de ABP serían desplazadas (aunque sí la mayoría dada la alta afinidad de SA por el receptor) y parte de SA podría entrar en el fotobionte. Al reducir la cantidad de SA captada por el alga, el efecto patógeno disminuiría de forma que el efecto letal sería sustituido por un mecanismo de control en el que el efecto parasitario estaría atenuado. La síntesis de nuevas moléculas de ABP (o las ya presentes) podrían desplazar a SA; sin embargo, su afinidad por el receptor es mucho menor liberando un menor número de moléculas de SA. Por otra parte, la unión de SA-receptor o ABP-receptor inhibe la actividad arginasa totalmente. Es posible, por tanto, que la unión ligando receptor conduzca a cambios conformacionales en el centro activo de la isolectina anulando su efecto tóxico.

2.-Estado de resíntesis. Reproducción sexual.

Tal como ocurre en otras asociaciones hongo-huésped la capacidad de secreción de ciertas enzimas degradativas del componente fúngico es muy temprana aproximadamente 2 min (Nicholson *et al.*, 1988). Las primeras moléculas de SA podrían matar al fotobionte en ausencia del receptor de pared. La entrada de SA provocaría un aumento en la concentración de poliaminas con el consiguiente incremento en la actividad glucanasa, provocando muerte celular en los primeros 30 minutos del contacto debido a la virulencia del hongo (Ahmadjian, 1987). Si bien la reproducción sexual parece posible en *X. parietina* (Ott, 1987 a y b) siendo

especialmente importante en los procesos evolutivos (Fashelt, 1991). En este sentido, sólo se han observado haustorios intracelulares en el líquen *X. parietina* en los primeros estadios de la resíntesis (Brubrick y Galun, 1986); además, en general, el éxito de las resíntesis se reduce fundamentalmente por la muerte del fotobionte en los estadios tempranos como consecuencia de la vilurencia del hongo (Ahdmajian, 1987). Sólo aquellas algas capaces de detener el ataque enzimático continuarían el proceso de resíntesis, es decir, aquellas que habiendo coevolucionado con el hongo hayan desarrollado los mecanismos moleculares de regulación y atenuación adecuados. La posterior interacción estrecha entre alga y hongo para formar las primeras escuámulas podrían desplazar la SA estableciéndose un mecanismo de equilibrio similar al descrito para el estado de simbiosis.

Las lectinas son proteínas conservadas desde el punto de vista genético y por tanto, con un importante papel fisiológico (enzimático o estructural). Shannon y Hankins (1981) defienden la teoría de que las isolectinas son sintetizadas por genes procedentes de un gen ancestral común por duplicación y posterior diferenciación. La presencia de dos isolectinas con la misma actividad enzimática apoya esta hipótesis. Por otra parte, una línea fúngica con ambas isoformas y que desarrollara un mecanismo de ataque atenuado como el descrito presentaría una mayor eficacia biológica que aquellos con una única molécula con actividad arginasa que mostrara un comportamiento de ataque virulento, puesto que conduciría a la muerte del parásito. Igualmente, la selección natural favorecería aquellas líneas algales que, desarrollando un único receptor capaz de unirse a dos isolectinas fúngicas potencialmente tóxicas, favorecieran mecanismos de defensa.

Por otra parte, la presencia de actividades enzimáticas en pared y segregables tales como ureasa y arginasa pueden ser eslabones de un complejo mecanismo de regulación metabólico. La unión de ambas proteínas inhibe sus respectivas actividades enzimática de forma que se produce un aumento de la concentración de urea y arginina en los espacios intercelulares. El aumento de urea activa la secreción

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmadjian, V. (1961): Studies on lichenized fungi. *The Bryologist*, **64**: 168-179.
- Ahmadjian, V. (1962): Investigations on lichen synthesis. *Am. J. Bot.*, **49**: 277-283.
- Ahmadjian, V. (1967): *The Lichen Symbiosis*. Blaisdell Publishing Co., Waltham, MA.
- Ahmadjian, V. (1982): Algal/fungal symbiosis. En *Progress in Phycological Research* (Round, F.J., Chapman, D.J., eds.), p. 179-233, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Ahmadjian, V. (1987): Coevolution in lichens. *Ann. New York Acad. Sci.*, **503**: 307-315.
- Ahmadjian, V. (1988): The lichen alga *Trebouxia*: does it occur free-living? *Plant Syst. Evol.* **158**:243-247.
- Ahmadjian, V. (1992): Basic mechanisms of signal exchange, recognition and regulation in lichens. En *Algae and Symbioses: Plants, Animals, Fungi, Viruses Interactions Explored* (Reisser, W., ed), p. 674-697. Biopress Limited Bristol. England.
- Ahmadjian, V. (1993): *The Lichen Symbiosis*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Ahmadjian, V., Jacobs, J.B. (1981): Relationship between fungus and alga in the lichen *Cladonia cristatella*. *Nature*, **289**: 169-172.
- Ahmadjian, V., Jacobs, J.B., (1985): Artificial reestablishment of lichens. VI. Comparison between natural and synthetic thalli of *Usnea strigosa*. *Lichenologist*, **17**: 149-166.
- Ahmadjian, V., Brink, J.J., Shehata, A.I. (1991): Molecular biology of lichens. Search for plasmid DNA and the question of gene movement between bionts. *Proc. Intern. Symp. Lichenol.*, Nippon Paint Co., Osaka, pp. 2-21.
- Andrews, G.A., Chavey, P.S., Smith, J.E. (1992): Reactivity of lichen lectins with blood typed canine erythrocytes. *Res. Veterin. Sci.*, **53**: 315-319.
- Arnold, W., Becker, A., Keller, M., Roxlav, A., Pühler, A. (1994): The role of *Rhizobium meliloti* surface polysaccharides in the infection of *Medicago sativa* nodules. *Endocyt. Cell Res.*, **10**: 17-28.
- Ascaso C (1980): A rapid method for the quantitative isolation of green algae from lichens. *Ann. Bot.*, **45**: 483.
- Ascaso, C., Galván, J. (1976): The ultrastructure of the symbionts of *Rhizocarpon geographicum*, *Parmelia conspersa* and *Umbilicaria pustulata* growing under dryness conditions. *Protoplasma*, **87**: 409-418.
- Asahina, Y., Shibata, S. (1954): *Chemistry of Lichen Substances*. Japan Society for Promotion of Science, Tokyo.
- Avalos, A., Vicente, C. (1987): The occurrence of lichen phenolics in the photobiont cells of *Evernia prunastri*. *Plant Cell Reports*, **6**: 74-76.

- Avalos, A., Legaz, M.E., Pérez-Urria, E., Vicente, C. (1985): L-arginine induces a thermostable repressor of urease on *Pseudoevernia furfuracea*. *Endocytobiosis Cell Res.*, **2**: 15-20.
- Avigad, G., Amaral, D., Asensio, C., Horecker, B.L. (1962): The D-galactose oxidase of *Polyporus circinatus*. *J. Biol. Chem.*, **237**: 2736-2743.
- Balasubramanian, N.K., Timm, D.E., Neet, K.E., Rao, A.G. (1993): The lectin from *Bauhinia purpurea*: effect of modification of lysine residues on conformation and biological properties. *J. Agr. Food Chem.*, **41**: 1844-1850.
- Baver, W.D., Bhuvaneswari, T.V., Mart, A.J., Turgeon, G. (1979): The initiation of infection in soybean by *Rhizobium*. 3. *R. japonicum* polysaccharide pretreatment induces root hair infectivity. *Plant Physiol.*, **63**: 135-142.
- Bayer, E.A., Skotelsky, E., Wynne, D., Wilckek, M. (1976): Preparation of ferritin-avidin conjugated by reductive alkylation for use in electron microscopic cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, **24**: 933-939.
- Beaven, G.H., Holiday, E.R. (1952): Ultraviolet absorption spectra of proteins and amino acids. *Adv. Prot. Chem.*, **7**: 319-386.
- Bertsch, A. (1966): CO₂-Gaswechsel und Wasserhaushalt der aerophilen Grünalge *Apatococcus lobatus*. *Planta*, **70**: 46-72.
- Beschel, R. (1955): Individuum und Alter bei Flechten. *Phyton (Austria)*, **6**: 60-68.
- Besford, R.T., Richardson, C.M., Campos, J.L., Tiburcio, A.F. (1993): Effect of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically stressed oat leaves. *Planta*, **189**: 201-206.
- Birecka, H., Ireton, K.P., Bitonti, A.J., McCann, P.P. (1991): Endogenous polyamine levels and dark-induced leaf senescence. *Phytochemistry* **30**: 105-108.
- Blanco, M.J., Suárez, C., Vicente, C. (1984): The use of urea by *Evernia prunastri* thalli. *Planta*, **162**: 305-310.
- Bohlool, B.B., Schmidt, E.L. (1974): Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis. *Science*, **185**: 269-271.
- Bold, H.C. (1973): *Morphology of Plants*. Harper and Row, New York.
- Bonfante-Fasolo, P. (1988): The role of the cell wall as a signal in mycorrhizal associations. En *Cell-to-Cell Signals in Plant, Animal and Microbial Symbioses* (Scannerini, S., Smith, D., Bonfante-Fasolo, P., Gianinazzi-Pearson, V., eds.), p. 219-235. Springer-Verlag, Berlin.

- Borkovich, K.A., Weiss, R.L. (1987):** Purification and characterization of arginase from *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem., **262**: 7081-7086.
- Bortwick, D.E., Dannenhoffer, J.M., Skaggs, M.J., Lister, R., Larkins, B.A., Thompson, G.A. (1992):** Pumpkin phloem lectin genes are specifically expressed in companion cells. The Plant Cell, **4**: 1539-1548.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C. (1993):** The galactose binding lectin from the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Distribution and site of synthesis. Insect Biochem. Biol., **23**: 233-242.
- Boyd, W.C. (1963):** The lectins: their present status. Vox Sanguinis, **8**: 1-32.
- Boyd, W.C., Shapleigh, E. (1954):** Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins. J. Immunol., **73**: 226-321.
- Broady, P.A., Guven, D., Greenfield, L., Thompson, K. (1987):** The biota and environment of fumaroles on Mt. Melbourne, northern victoric land. Polar Biol., **7**: 97-112.
- Broekaert, W.F., Van Parijs, J., Leyne, F., Joos, H., Peumans, W.J. (1989):** A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. Science, **245**: 1100-1102.
- Brock, T.D. (1975):** The effect of water potential on photosynthesis in whole lichens and in their liberated algal components. Planta, **124**: 13-23.
- Brunner, U., Honegger, R. (1985):** Chemical and ultrastructural studies on the distribution of sporopollenin-like biopolymers in six genera of lichen phycobionts. Can. J. Bot., **63**: 2221-2230.
- Bubrick, P., Galun, M. (1980):** Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell walls. Correlation between binding patterns and cell wall cytochemistry. Protoplasma, **104**: 167-173.
- Bubrick, P., Galun, M. (1986):** Spore to spore resynthesis of *Xanthoria parietina*. Lichenologist, **18**: 47-49.
- Bubrick, P., Galun, M., Frensdorff, A. (1981):** Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell wall. Localization in the intact lichen and cultured mycobiont. Protoplasma, **105**: 207-211.
- Bubrick, P., Frensdorff, A., Galun, M. (1985):** Proteins from the lichen *Xanthoria parietina* which bind to phycobiont cell wall. Isolation and partial purification of an algal-binding protein. Symbiosis, **1**: 85-95.
- Bubrick, P., Galun, M., Ben-Yaacov, M., Frensdorff, A. (1982):** Antigenic similarities and differences between symbiotic and cultured phycobionts from the lichen *Xanthoria parietina*. FEMS Microbiol. Lett., **13**: 435-438.
- Büdel, B. (1990):** Anatomical adaptations to the semiarid/arid environment in the lichen genus *Peltula*. Bibl. Lichenol., **38**: 47-61.

- Dazzo, F.B., Truchet, G.L. (1984):** Attachment of nitrogen-fixing bacteria to roots of host plants. En *Current Development in Biological Nitrogen Fixation* (Subba Rao, N.S., ed.), p. 65-100. Edward Arnold, London.
- Demming-Adams, B., Maguas, C., Adams, W.W., Meyer, A., Kilian, E., Lange, O.L. (1990):** Effect of high light on the efficiency of photochemical energy conversion in a variety of lichen species with green and blue-green phycobionts. *Planta*, **180**: 400-409.
- Desai, N.N., Allen, A.K., Neuberger, A. (1981):** Some properties of the lectin from *Datura stramonium* (thorn-apple) and the nature of its glycoprotein linkages. *Biochem. J.*, **197**: 345-353.
- Drolet, G., Dumbroff, E.B., Legge, R.L., Thompson, J.E. (1986):** Radicle scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry*, **25**: 367-372.
- Debray, H., Wieruszeski, J.M., Strecker, G., Franz, H. (1992):** Structural analysis of the carbohydrate chains isolated from mistletoe (*Viscum album*) lectin I. *Carbohydrate Res.* **236**: 135-143.
- Devon, D.R., Bold, H.C. (1960):** Phycological studies I. Exploratory studies of Texas soil algae. Univ. Texas Publ., **6022**: 1-70.
- Díaz, C.L., Melchers, L.S., Hooykaas, P.J.J., Lugtenberg, B.J.J., Kijne, J.W. (1989):** Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature*, **338**: 579-581.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956):** Colorimetric methods for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, **28**: 350-356.
- Edwards, H.H., Allen, P.J. (1970):** A fine-structure study of the primary infection process during infection of barley by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Phytopathol.*, **60**: 1504-1509.
- Eijdsen, R.R., Haedemaeker, F.J., Díaz, C.L., Lugtenberg, J.J., de Pater, B.S., Kijne, J.W. (1992):** Mertational analysis of pea lectin. Substitution of Asn¹²¹ for Asp in the monosaccharide-binding site eliminates mannose/glucose-binding activity. *Plant Mol. Biol.*, **20**: 1049-1058
- Elad, Y., Barak, R., Chet, I. (1983):** Possible role of lectins in mycoparasitism. *J. Bacteriol.*, **154**: 1431-1435.
- Elix, J.A., Whitton, A.A. (1984):** Recent progress in the chemistry of lichen substances. En *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G.W., eds.), p. 103-234. Springer-Verlag, Viena.
- Emmett, R.W., Parbery, D.G. (1975):** Appressoria. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **13**: 147-167.
- Epstein, L., Laccetti, L., Staples, R.C., Hoch, H.C. (1987):** Cell-substratum adhesive protein involved in surface contact responses of the bean rust fungus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **30**: 373-388.
- Escribano, M.I., Legaz, M.E. (1985):** Putrescine accumulation does not affect RNA metabolism in the lichen *Evernia prunastri*. *Endocyt. Cell Res.*, **2**: 239-248.

- Escribano, M.I., Legaz, M.E. (1988):** High performance liquid chromatography of the dansyl derivatives of putrescine, spermidine and spermine. *Plant Physiol.*, **87**: 519-522.
- Escribano, M.I., Merodio, C. (1994):** The relevance of polyamine levels in cherimoya (*Annona cherimola*) fruit ripening. *J. Plant Physiol.*, **143**: 207-212.
- Esser, K. (1976):** *Kryptogamen: Blaualgen, Algen, Pilze, Flechten*. Springer-Berlag, Berlin.
- Estola, E., Vartia, K.O. (1955):** Phytoagglutinins in lichens. *Ann. Med. Exptl. Biol. Fennica*, **33**: 392-395.
- Etzler, M.E. (1985):** Plant lectins: molecular and biological aspects. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **36**: 209-234.
- Evans, P.T., Malmberg, R.L. (1989):** Do polyamines have roles in plant development ? *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**: 235-269.
- Fahselt, D. (1985):** Multiple enzyme forms in lichens. En *Lichen Physiology and Cell Biology* (Brown, D.H., ed.), p. 129-143. Plenum Press, London.
- Fahselt, D. (1987):** Electrophoretic analysis of esterase and alkaline phosphatase enzyme forms in single spore cultures of *Cladonia cristatella*. *Lichenologist*, **19**: 71-75.
- Fahselt, D. (1991):** Enzyme similarity as an indicator of evolutionary divergence: *Stereocaulon saxatile*. *Symbiosis*, **11**: 119-130.
- Friedman, E.J., Hua, M., Ocampo-Friedman, R. (1988):** Cryptoendolythic lichen and cyanobacterial communities of the Ross Desert, Antarctica. *Polarforschung*, **58**: 251-259.
- Frield, T. (1989):** Comparative ultrastructure of pyrenoids in *Trebouxia* (*Microthamniales*, *Chlorophyta*). *Plant Syst. Evol.*, **164**: 145-159.
- Fry, S.C., Aldington, S., Hetherington, P.R., Ditken, J. (1993):** Oligosaccharides as signals and substrate in the plant cell wall. *Plant Physiol.*, **103**: 1-5.
- Galun, M. (1990):** Lichen research: an overview with some emphases. En *Endocytobiology IV* (Nardon, P., Gianinazzi-Pearson, V., Grenier, A.M., Margulis, L., Smith, D.C., eds.), p. 161-168. INRA, Paris.
- Galun, M., Bubrick, P., Frensdorff, A. (1984):** Initial stages in fungus-alga interaction. *Lichenologist*, **16**: 103-110.
- Galun, M., Bubrick, P. (1984):** Physiological interactions between the partners of the lichen symbiosis. En *Encyclopedia of Plant Physiology. Cellular Interactions*, (Linskens, H.E., Heslop-Harrison, J., eds.), p. 362. Springer-Verlag, Berlin.
- Gärtner, G. (1985):** Die Gattung *Trebouxia* (*Chlorellales*, *Chlorophyceae*). *Arch. Hydrobiol. Suppl.* **71** (Algal Stud. 41): 495-548.

- Gavilanes, J.G., González de Buitrago, G., Pérez-Castelló, R., Rodríguez, R. (1982):** Isolation, characterization and amino acid sequence of an ubiquitin-like protein from insect eggs. *J. Biol. Chem.*, **257**: 10267-10270.
- Gianinazzi-Pearson, V., Bonfante-Fasolo, P., Dexheimer, J. (1986):** Ultrastructural studies of surface interactions during adhesion and infection by ericoid endomycorrhizal fungi. En *Recognition in Microbe-Plant Symbiotic and Pathogenic Interactions* (Lugtenborg, B., ed.). Vol. 4, p. 273-282. Springer-Verlag, Berlin.
- Giollant, M., Guillot, J., Damez, M., Dusser, M., Didier, P., Didier, E. (1993):** Characterization of a lectin from *Lactarius diterrimus*. *Plant Physiol.*, **101**: 513-522.
- Gomori, G. (1952):** *Microscopic Histochemistry. Principles and Practice*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Green, T.G.A., Lange, O.L. (1991):** Ecophysiological adaptations of the lichen genera *Pseudocyphellaria* and *Sticta* to south temperate rainforest. *Lichenologist*, **23**: 267-282.
- Gold, E.R., Balding, P. (1975):** *Receptor-specific Protein: Plant and Animal Lectins*. Gold, E.R., Balding, P (eds). Amsterdam: Excerpta Medica.
- Green, T.G.A., Kilian, E., Lange, O.L. (1991):** *Pseudocyphellaria dissimilis*: a desiccation-sensitive, highly shade-adapted lichen from New Zealand. *Oecologia*, **85**: 498-503.
- Greenberg, D.M. (1955):** Arginase. En *Methods in Enzymology* (Kolowick, S.P., Kaplan, N.O., eds.), Vol. 2, pp. 368-374. Academic Press, New York.
- Griffiths, J., Black, J. (1987):** Separation and identification of alkaline phosphatase isoenzymes and isoforms in serum of healthy persons by isoelectric focusing. *Clin. Chem.*, **33**: 2171-2177.
- Guarino, L.A., Cohen, S.S. (1979a):** Uptake and accumulation of putrescine and its lethality in *Anacytis nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 3184-3188.
- Guarino, L.A., Cohen, S.S. (1979b):** Mechanism of toxicity of putrescine and its lethality in *Anacytis nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**: 3660-3664.
- Gupta, D., Brewer, C.F. (1994):** Homogeneous aggregation of the 14-kDa β -galactoside specific vertebrate lectin complex with asialofetuin in mixed systems. *Biochem.* **33**: 5526-5530.
- Hageman, C., Fahselt, D. (1990):** Enzyme electromorph variation in the lichen family *Umbilicariaceae*: within-stand polymorphism in umbilicate lichens of eastern Canada. *Can. J. Bot.*, **68**: 2636-2643.
- Hammer, J.E., Howard, R.J., Chumley, F.G., Valent, B. (1988):** A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. *Science*, **239**: 288-290.
- Hawksworth, D.L. (1988):** The variety of fungal-algal symbioses, their evolutionary significance and the nature of lichens. *Bot. J. Linnean Soc.*, **96**: 3-20.

Hawksworth, D.L. (1992): The need for a more effective biological nomenclature for the 21st century. *Bot. J. Linnean Soc.*, **109**: 543-567.

Hernández, E., Ortiz, R., López, F., Masso, F., Montañó, L.F., Martinage, A., Zenteno, E. (1993): Purification and characterization of a galactose-specific lectin from *Phylocybe barrerae*. *Phytochemistry*, **32**: 1209-1211.

Hicha, D.K., Bakaltcheva, I., Schmitt, J.M. (1993): Galactose-specific lectins protect isolated thylakoids against freeze-thaw damage. *Plant Physiol.*, **103**: 59-65.

Hill, D.J. (1985): Changes in photobiont dimensions and numbers during codevelopment of lichen symbionts. En *Lichen Physiology and Cell Biology* (Brown, D.H., ed.), p. 303-317. Plenum Press, London.

Hirs, C.H.W. (1967): Performic acid oxidized samples were used to determine half-cysteine content. En *Methods in Enzymology* (Hirs, C.H.W., ed.), Vol 11, p. 197-199. Academic Press, New York.

Ho, S.C., Schindler, M., Wang, J.L. (1990): Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum*. II. Isolation and characterization of galactose-specific lectin. *J. Cell Biol.*, **111**: 1631-1638.

Hoch, H.C., Staples, R.C. (1987): Structural and chemical changes among the rust fungi during appressorium development. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **25**: 231-247.

Hoedemaeker, F.J., Eijdsen, R.R., Díaz, C.L., de Pater, B.S., Kijne, J.W. (1993): Desestabilization of pea lectin by substitution of a single amino acid in a surface loop. *Plant Mol. Biol.*, **22**: 1039-1046.

Hoedemaeker, F.J., Richardson, M., Díaz, C.L., de Pater, B.S., Kijne, J.W. (1994): Pea (*Pisum sativum*) seed isolectins 1 and 2 and pea root lectin result from carboxy peptidase-like processing of a single gene product. *Plant Mol. Biol.*, **24**: 75-81.

Holopainen, T., Kauppi, M. (1989): A comparison of light fluorescence and electron microscopy observations in assessing the SO₂ injury of lichens under different moisture conditions. *Lichenologist*, **21**: 119-134.

Honegger, R. (1984): Cytological aspects of the mycobiont-photobiont relationship in lichens. *Lichenologist*, **16**: 111-127.

Honegger, R. (1986): Ultrastructural studies in lichens. II. Mycobiont and photobiont cell wall surface layers and adhering crystalline lichen products in four *Parmeliaceae*. *New Phytol.* **103**: 797-808.

Honegger, R. (1987): Questions about pattern formation in the algal layer of lichens with stratified (heteromerous) thalli. *Bibl. Lichenol.*, **25**: 59-71.

Honegger, R. (1990): Surface interactions in lichens. En *Experimental Phycology, Cell Walls and Surfaces, Reproduction, Photosynthesis* (Wiessner, W., Robinson, D.G., Starr, R.C., eds.) p. 40-54. Springer-Verlag, Berlin.

Honegger, R. (1991): Functional aspects of the lichen symbiosis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42**: 553-578.

Honegger, R., Brunner, U. (1981): Sporopollenin in the cell walls of *Coccomyxa* and *Myrmecia* phycobionts of various lichens: an ultrastructural and chemical investigation. *Can. J. Bot.*, **59**: 2713-2734.

Honegger, R., Kutasi, V. (1990): Anthraquinone production in three aposymbiotically cultured teloschistalean lichen mycobionts: the role of carbon source. En *Endocytobiology IV* (Nardon, P., Gianinazzi-Pearson, V., Grenier, A.M., Margulis, L., Smith, D.C., eds.), p. 175-178. INRA, Paris.

Hourmant, A., Mereau, N., Pienot, M., Cann, C., Careff, J. (1994): Influence of polyamines on growth and metabolism of *Dunaliella primolecta*. *Acta Bot. Neerl.* **43**: 129-136.

Ikamoto, M., Tabata, M., Miyako, T., Kono, T., Mori, M., Totati, M., Murachi, T. (1990): Expression of human liver arginase in *Escherichia coli*. Purification and properties of the product. *Biochem. J.*, **270**: 697-703.

Ingram, G.A. (1982): Haemagglutinins and haemolysis in selected lichen species. *The Bryologist*, **85**: 389-393.

Jacobi, W.R., Amerson, H.V., Mott, R.L. (1982): Microscopy of cultured loblolly pine seedling and callus inoculated with *Cronartium fusiforme*. *Phytopathology*, **72**: 138-143.

Jonas, L., Putzke, H.P. (1992): Light and electron microscopic studies of lectin binding on the glycocalyx of rat pancreatic cells. II. Light microscopic changes after induction of an olive-oil pancreatitis. *Acta Histochem.*, **93**: 388-396.

Jonas, L., Ostwald, Ch., Griethe, W., Letko, G. (1991): Light and electron microscopic studies of lectin binding on the glycocalyx of rat pancreatic cells. I. Normal tissue and isolated cells. *Acta Histochem.*, **91**: 213-224.

Jonas, L., Fulda, G., Walzel, H., Schulz, V. (1993): Lectin binding studies with FITC-marked WGA and UEA I and flowcytometric measurements on isolated rat pancreatic acinar cells. *Acta Histochem.*, **95**: 45-52.

Jonas, L., Walzel, H., Bremer, H., Wiedlocka, A. (1992): Comparative studies on internalization of gold labelled mistetoe lectin I (ML_I), its subunits, and of an immunotoxin into mouse L1210V leukemia cells. *Acta Histochem.*, **92**: 46-53.

Kamemura, K., Furuichi, Y., Umekawa, H., Takehashi, T. (1993): Purification and characterization of novel lectins from great Northern bean, *Phaseolus vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1158**: 181-188.

Kao, C.H. (1993): Polyamines and rice leaf senescence. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **34**: 299-305.

Kao, C.H. (1994): Endogenous polyamine levels and dark-induced senescence of detached corn leaves. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **35**: 15-18.

- Legaz, M.E., Vicente, C. (1982):** Two forms of arginase in *Evernia prunastri* thallus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**: 1441-1446.
- Legaz, M.E., Vicente, C. (1983):** Endogenous inactivators of arginase, L-arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. *Plant Physiol* **71**: 300-302.
- Legaz, M.E., Vicente, C. (1989):** Regulation of urease activity in *Cladonia dendroides* and its photobiont by lichen phenols. *Plant Sci.*, **63**: 15-24.
- Legaz, M.E., de Torres, M., Escribano, M.I. (1985):** Putrescine affects mannitol metabolism in the lichen *Evernia prunastri*. *Photosynthetica*, **19**: 230-236.
- Legaz, M.E., Avalos, A., de Torres, M., Escribano, M.I., González, A., Martín-Falquina, A., Pérez-Urria, E., Vicente, C. (1986):** Annual variations in arginine metabolism and phenolic content of *Evernia prunastri*. *Environ. Exptl. Bot.*, **26**: 385-396.
- Legaz, M.E., González de Buitrago, G., Vicente, C. (1982):** Exogenous supply of L-arginine modifies free amino acids content in *Evernia prunastri* thallus. *Phyton (BA)*, **42**: 213-218.
- Legaz, M.E., Martín, L., Pedrosa, M.M., Vicente, C., de Armas, R., Martínez, M., Medina, I., Rodríguez, C.W. (1990):** Purification and partial characterization of a fructanase which hydrolyzes natural polysaccharides from sugarcane juice. *Plant Physiol.*, **92**: 679-683.
- Lenova, L.J., Blum, O.B. (1983):** To the question of the third component in lichens. *Bot. Zurn.*, **68**: 21-28.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C., Dénarié, J. (1990):** Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, **344**: 781-784.
- Lewis, D.H. (1973):** Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. *Biol. Rev.*, **48**: 261-278.
- Lewis, D.H. (1987):** Evolutionary aspects of mutualistic associations between fungi and photosynthetic organisms. En *Evolutionary Biology of the Fungi* (Brasier, C.M., Rayner, A.D.M., Moore, D., eds.), p. 161-178. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lienes, I.E. (1986):** Nutritional significance of lectins in the diet. En *The Lectins* (Lienes, I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J., eds.), p. 527-552. Academic Press, San Diego.
- Lilly, V.G., Barnett, H.L. (1951):** *Physiology of the Fungi*. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Lison, L., (1960):** *Histochimie et cytochimie animales, I*. Gauthier-Villars. Paris
- Lockhart, C.M., Rowell, P., Stewart, W.D.P. (1978):** Phytohaemagglutinins from the nitrogen-fixing lichens *Peltigera canina* and *P. polydactyla*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **3**: 127-130.

- Legaz, M.E., Vicente, C. (1982):** Two forms of arginase in *Evernia prunastri* thallus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**: 1441-1446.
- Legaz, M.E., Vicente, C. (1983):** Endogenous inactivators of arginase, L-arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase in *Evernia prunastri* thallus. *Plant Physiol* **71**: 300-302.
- Legaz, M.E., Vicente, C. (1989):** Regulation of urease activity in *Cladonia dendroides* and its photobiont by lichen phenols. *Plant Sci.* **63**: 15-24.
- Legaz, M.E., de Torres, M., Escribano, M.I. (1985):** Putrescine affects mannitol metabolism in the lichen *Evernia prunastri*. *Photosynthetica*, **19**: 230-236.
- Legaz, M.E., Avalos, A., de Torres, M., Escribano, M.I., González, A., Martín-Falquina, A., Pérez-Urria, E., Vicente, C. (1986):** Annual variations in arginine metabolism and phenolic content of *Evernia prunastri*. *Environ. Exptl. Bot.*, **26**: 385-396.
- Legaz, M.E., González de Buitrago, G., Vicente, C. (1982):** Exogenous supply of L-arginine modifies free amino acids content in *Evernia prunastri* thallus. *Phyton (BA)*, **42**: 213-218.
- Legaz, M.E., Martín, L., Pedrosa, M.M., Vicente, C., de Armas, R., Martínez, M., Medina, I., Rodríguez, C.W. (1990):** Purification and partial characterization of a fructanase which hydrolyzes natural polysaccharides from sugarcane juice. *Plant Physiol.*, **92**: 679-683.
- Lenova, L.J., Blum, O.B. (1983):** To the question of the third component in lichens. *Bot. Zurn.*, **68**: 21-28.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C., Dénarié, J. (1990):** Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, **344**: 781-784.
- Lewis, D.H. (1973):** Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. *Biol. Rev.*, **48**: 261-278.
- Lewis, D.H. (1987):** Evolutionary aspects of mutualistic associations between fungi and photosynthetic organisms. En *Evolutionary Biology of the Fungi* (Brasier, C.M., Rayner, A.D.M., Moore, D., eds.), p. 161-178. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lienes, I.E. (1986):** Nutritional significance of lectins in the diet. En *The Lectins* (Lienes, I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J., eds.), p. 527-552. Academic Press, San Diego.
- Lilly, V.G., Barnett, H.L. (1951):** *Physiology of the Fungi*. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Lison, L., (1960):** *Histochimie et cytochimie animales, I*. Gauthier-Villars. Paris
- Lockhart, C.M., Rowell, P., Stewart, W.D.P. (1978):** Phytohaemagglutinins from the nitrogen-fixing lichens *Peltigera canina* and *P. polydactyla*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **3**: 127-130.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951):** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- McAuley, P.J., Smith, D. (1982).** The green hydra symbiosis. V. Stages in the intracellular recognition of algal symbionts by digestive cells. *Proceedings of the Royal Society of London Series B.* **216**: 415-426.
- Makella, O. (1957):** Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds. *Ann. Mad. Exptl. Biol. Fenn.*, **35**: 1-133.
- Malachowski, J.A., Baker, K.K., Hooper, G.R. (1980):** Anatomy and algal-fungus interactions in the lichen *Ulsnea cavernosa*. *J. Phycol.*, **16**: 346-354.
- Mandal, D.K., Brewer, C.F. (1992):** Interactions of Concanavalin A with glycoproteins: formation of homogeneous glycoprotein-lectin cross-linked complexes in mixed precipitations systems. *Biochem.* **31**: 12602-12609.
- Mandal, D.K., Nieves, E., Bhattacharyya, L., Orr, G.A., Roboz, J., Yu, Q., Brewer, C.F. (1994):** Purification and characterization of three isolectins of soybean agglutinin. Evidence for C-terminal truncation by electrospray ionization mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.*, **221**: 547-553.
- Marincovic, D., Ayala, F.J. (1977):** Fitness of aloenzyme variants in *Drosophila melanogaster*. III. Possible factors contributing to the maintenance of polymorphisms in nature. *Genetica*, **74**: 65-70.
- Martín-Falquina, A., Legaz, M.E. (1984):** Purification and properties of the constitutive arginase of *Evernia prunastri*. *Plant Physiol.*, **76**: 1065-1069.
- Marx, M., Peveling, E. (1983):** Surface receptors in lichen symbionts visualized by fluorescence microscopy after use of lectins. *Protoplasma* **114**: 52-61.
- Mateos, J.L., Pedrosa, M.M., Molina, M.C., Pereira, E.C., Vicente, C., Legaz, M.E. (1993):** Involvement of phytochrome-mediated cyclic AMP in the synthesis and deposition of fumarprotocetraric acid on the cortical hyphae of *Cladonia verticillaris*. *Plant Physiol. Biochem.*, **31**: 667-674.
- McAuley, P.J., Smith, D.C. (1982):** The green *Hydra* symbiosis. V. Stages in the intracellular recognition of algal symbionts by digestive cells. *Proc. Royal Soc. London*, **B. 216**: 7-23.
- Merrill, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A., Ebert, M.H. (1981):** Ultrasensitive stain for protein in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*, **211**: 1437.
- Mims, C.W., Richardson, E.A. (1989):** Ultrastructure of appressorium development by basidiospore gemling of the rust fungus *Gymnosporangium juniperi-virginianae*. *Protoplasma*, **148**: 111-119.
- Mirelman, D., Galun, E., Sharon, M., Lotan, R. (1975):** Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. *Nature*, **256**: 414-416.

- Mitchell, J.L.A., Diveley, R.R., Bareyal-Leyser, A., Mitchell, J.L. (1992):** Abnormal accumulation and toxicity of polyamines in a difluoromethylornithine-resistant HTC cell variant. *Biochim. Biophys. Acta*, **1136**: 136-142.
- Mo, H., VanDamme, E.J.M., Peuman, W.J., Goldstein, J. (1993):** Purification and characterization of a mannose-specific lectin from shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs. *Arch. Biochem. Biophys.*, **306**: 431-438.
- Mo, H., VanDamme, E.J.M., Peuman, W.J., Goldstein, J. (1994):** Isolation and characterization of an N-acetyl-D-galactosamine-binding lectin from Dutch irish bulbs which recognizes the blood group A disaccharide (GalNAc-a 1-3 Gal). *J. Biol. Chem.*, **269**: 7666-7673.
- Molina, M.C., Vicente, C. (1994):** The distribution and mobility of the phycobiont in the thalli and apothecia of *Usnea aurantiaco-atra*. *Phyton (BA)*, **56**: 81-89.
- Mosbach, K. (1973):** Biosynthesis of lichen substances. En *The Lichens* (Ahmadjian, V., Hale, M.E., eds.), p. 523-546. Academic Press, New York.
- Nagai, K., Yamaguchi, H. (1993):** Direct demonstration of the essential role of the intramolecular high-mannose oligosaccharide chains in the folding and assembly of soybean (*Glycine max*) lectin polypeptides. *J. Biochem.*, **113**: 123-125.
- Nagai, K., Shibata, K., Yamaguchi, H. (1993):** Role of intramolecular high-mannose chains in the folding and assembly of soybean (*Glycine max*) lectin polypeptides: studies by the combined use of spectroscopy and gel filtration-size analysis. *J. Biochem.*, **114**: 830-834.
- Nagel, C.W., Wilson, T.M. (1969):** The isolation of oligogalacturonic acids by column chromatography. *J. Chromatogr.*, **41**: 410-416.
- Nash, T.H., Kappen, L., Lösch, R., Larson, D.W., Matthes-Sears, U. (1987):** Cold resistance of lichens with *Trentepohlia* or *Trebouxia* photobionts from the North American west coast. *Flora*, **179**: 241-251.
- Nelson, N. (1944):** Azotometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**: 375-380.
- Nicholson, R. L., Yoshioka, H., Yamaoka, N., Kunoh, H. (1988):** Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis* II. Release of esterase enzyme from conidia in response to a contact stimulus. *Exp. Mycol.* **12**: 336-349.
- Nordbring-Hertz, B. (1988):** Ecology and recognition in the nematode-nematophagous fungus system. En *Advances in Microbial Technology* (Marshall, K.C., ed.), p. 81-114. Plenum Press, New York.
- O'Farrel, P.H. (1975):** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**: 4007-4021.

- Ott, S. (1987a):** Sexual reproduction and developmental adaptations in *X. parietina*. Nord. J. Bot. **7**: 219-228.
- Ott, S. (1987b):** Reproductive strategies in lichens. Bibl. Lichenol. **25**: 81-93.
- Ott, S., Scheidegger, C. (1992):** The role of parasitism in the co-development and colonization of *Peltigera euploca* and *Glyphopeltis lingustica*. Symbiosis, **12**: 159-172.
- Parchment, R.E. (1993):** The implication of a unified theory of programmed cell death, polyamines, oxyradicals and histogenesis in the embryo. Int. J. Dev. Biol., **37**: 75-83.
- Paus, E., Steen, H.B. (1978):** Mitogenic effect of α -mannosidase of lymphocytes. Nature, **272**: 452-454.
- Pedrosa, M.M. (1993):** Isoformas de arginasa de *Evernia prunastri*: caracterización y regulación por fenoles. Tesis Doctoral, Universidad Complutense, Madrid.
- Pedrosa, M.M., Legaz, M.E. (1991a):** Chemical stability of a lichen depside, evernic acid, in buffered solutions, analyzed by high performance liquid chromatography. Plant Physiol. (Life Sci. Adv.), **10**: 57-62.
- Pedrosa, M.M., Legaz, M.E. (1991b):** Binding studies of evernic acid to purified constitutive arginase of *Evernia prunastri* by SE-HPLC. Symbiosis, **11**: 345-357.
- Pedrosa, M.M., Legaz, M.E. (1991):** Binding studies of evernic acid to purified constitutive arginase of *Evernia prunastri* by SE-HPLC. Symbiosis, **11**: 345-357.
- Pedrosa, M.M., Legaz, M.E. (1993):** Distribution of lichen phenolics in *Evernia prunastri* thalli and their secretion to the media as a function of the incubation time on L-ornithine or L-arginine. En *Endocytobiology V* (Sato, S., Ishida, M., Ishikawa, H., eds.), p. 75-80. Tübingen University Press, Tübingen.
- Pedrosa, M.M., Legaz, M.E. (1995):** Separation of arginase isoforms by capillary zone electrophoresis and isoelectric focusing in density gradient column. Electrophoresis, **16**: 659-669.
- Pendland, J.C., Boucias, D.G. (1993):** Variations in the ability of galactose and mannose-specific lectins to bind to cell wall surfaces during growth of the insect pathogenic fungus *Paecilomyces farinosus*. Eur. J. Cell Biol., **60**: 322-330.
- Pérez-Urria, E., Vicente C. (1989):** Purification and some properties of a secreted urease from *Evernia prunastri*. J. Plant Physiol., **133**: 692-695.
- Pérez-Urria, E., Rodríguez, M., Vicente, C. (1989):** Algal partner regulates fungal urease in the lichen *Evernia prunastri* by producing a protein which inhibits urease synthesis. Plant Mol. Biol., **13**: 665-672.
- Pérez-Urria, E., Avalos, A., Guzman, G., Vicente, C (1993):** Urease production and secretion by three antarctic lichen species. Endocytobiosis Cell Res. **9**: 239-243.

- Petit, P. (1982):** Phytolectins from nitrogen-fixing lichen *Peltigera horizontalis*: the binding pattern of primary protein extract. *New Phytol.*, **91**: 705-710.
- Petrescu, S.M., Petrescu, D.J., Füdiger, E.F. (1993):** Purification and partial characterization of a lectin from *Datura innoxia* seeds. *Phytochemistry*, **34**: 343-348.
- Planelles, V., Legaz, M.E. (1987):** Purification and some properties of the secreted arginase of the lichen *Evernia prunastri* and its regulation by usnic acid. *Plant Sci.*, **51**: 9-16.
- Pool, R.R. (1979):** The role of algal antigenic determinates in the recognition of potential algal symbionts by cells of *Chlorohydra*. *J. Cell Sci.*, **35**: 367-379.
- Raabo, E., Terkildsen, T.C. (1960):** On the enzymatic determination of blood glucose. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **12**: 402-409.
- Rajam, M.V., Weinstein, L.H., Galston, A.W. (1985):** Prevention of a plant disease by specific inhibition of fungal polyamine biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 6874-6878.
- Raymond, W.R., Nagel, C.W. (1969):** Gas-liquid chromatographic determination of oligogalacturonic acids. *Anal. Chem.*, **41**: 1700-1703.
- Reynolds, S. (1963):** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**: 200-211.
- Rodríguez, M., Vicente, C. (1991):** Water status and urease secretion from two ecotypes of *Xanthoria parietina*. *Symbiosis*, **11**: 255-262.
- Rundel, P.W. (1978):** The ecological role of secondary lichen substances. *Biochem. System. Ecol.*, **6**: 157-170.
- Rundel, P.W. (1988):** Water relations. En *Handbook of Lichenology* (Galkun, M., ed.) Vol. 2, p. 17-36. CRC Press, Boca Raton.
- Saikawa, M. (1982):** An electron microscope study of *Meia coniospora*, an endozoic nematophagous hyphomycete. *Can. J. Bot.*, **60**: 2019-2023.
- Sankaravarayanan, R., Puri, K.D., Ganesh, V., Banerjee, R., Surolia, A., Vijayan, M. (1993):** Crystallization and preliminary X-ray studies of the basic lectin from winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*). *J. Mol. Biol.*, **229**: 558-560.
- Santos, M., Claparols, I., Torne, J.M. (1993):** Effect of exogenous arginine, ornithine, methionine and t-aminobutyric acid on maize (*Zea mays*) embryogenesis and polyamine content. *J. Plant Physiol.*, **142**: 74-80.
- Schlumbaum, A., Mauch, F., Vögeli, V., Boller, T. (1986):** Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature*, **324**: 365-367.

- Segovia, M., Vicente, C. (1994): Two-step regulation of algal adenylyl cyclase activity by phytochrome in the lichen *Evernia prunastri*. J. Exptl. Botany, **45**: 1497-1500.
- Shannon, L.M., Hankins, C.N. (1981): Enzymatic properties of phytohaemagglutinins. En *The Phytochemistry of Cell Recognition and Cell Surface Interactions* (Loewus, F.A., Ryan, C.A., eds.), p. 93-114. Plenum Press, New York.
- Shapiro, I.A. (1977): Urease activity in lichens. Fiziol. Rast., **24**: 1135-1139.
- Sheard, J.W. (1977): Paleogeography, chemistry and taxonomy of the lichenized ascomycetes *Dimeleana* and *Thamnolia*. The Bryologist, **80**: 100-118.
- Slocum, R.D., Ahmadjian, V., Hildredth, K.C. (1980): Zoosporogenesis in *Trebouxia gelatinosa*: ultrastructure potential for zoospore release and implications for the lichen association. Lichenologist, **12**: 173-187.
- Slocum R.D., Kaur-Sawhney R., Galston A.W. (1984): The physiology and biochemistry of polyamines in plants. Arch. Biochem. Biophys. **235**: 283-303.
- Smith, A.L. (1927): *Lichens*. Cambridge.
- Smith, D.C. (1962): The biology of lichen thalli. Biol. Rev. **37**: 537-570.
- Smith, D.C (1974): Transport from symbiotic algae and symbiotic chloroplasts to host cells. Symposia of the Society for Experimental Biology **28**: 437-508.
- Smith, D.C. (1981): The role of nutrient exchange in recognition between symbionts. Ber. Deutsch. bot. Ges., **94**: 517-528.
- Smith, D.C., Douglas, A.E. (1987): *The Biology of Symbiosis*. Edward Arnold (Publ.) Ltd., London.
- Smith, G.B., Wollum, A.G. (1993): Physicochemical and D-galactose-mediated interactions in the attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to roots of *Glycine max*. Can. J. Microbiol., **39**: 245-251.
- Somogyi, M. (1952): Notes on sugar determination. J. Biol. Chem., **195**: 19-32.
- Snelgar, W.P., Green, T.G.A. (1981): Carbon dioxide exchange in lichens: apparent photorespiration and possible role of CO₂ refixation in some members of the *Stictaceae* (*Lichenes*). J. Exptl. Bot., **32**: 661-668.
- Snelgar, W.P., Green, T.G.A., Wilkins, A.L. (1981): Carbon dioxide exchange in lichens: resistance to CO₂ uptake at different thallus water contents. New Phytol., **88**: 353-361.
- Spiro, R.G. (1960): Studies on fetuin, a glycoprotein of fetal serum. I. Isolation, chemical composition, and physicochemical properties. J. Biol. Chem., **235**: 2860-2869.
- Spiro, R.G., Bhoyroo, V.D. (1974): Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin. J. Biol. Chem., **249**: 5704-5717.

- Spurr, A.R. (1969):** A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, **26**: 31-43.
- Standard Methods (1955):** American Public Health Association Inc, p. 390. New York.
- Stanier, R.Y., Adelberg, E.A., Ingraham, J.L. (1977):** *General Microbiology*. MacMillan, London.
- Stanislaus, R.C., Maravolo, N.C. (1994):** The influence of polyamines on senescence in *Marchantia polymorpha*. *The Bryologist*, **97**: 162-165.
- Stocker-Wörgötter, E., Türk, R. (1987):** Die Resynthese der Flechte *Verrucaria macrostoma* unter Laborbedingungen. *Nova Hedwigia*, **44**: 55-68.
- Stocker-Wörgötter, E., Türk, R. (1989):** Laborversuche zur Kultivierung von Blatt-und Strauchflechten und deren Komponenten. *Nova Hedwigia*, **48**: 207-228.
- Stocker-Wörgötter, E., Turk, R. (1991):** Artificial resynthesis of thalli of the cyanobacterial lichen *Peltigera praetextata* under laboratory conditions. *Lichenologist*, **23**: 127-138.
- Strain, H.H., Cope, B.T., Svec, W.A. (1971):** Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls. En *Methods in Enzymology*, (A. San Pietro, ed), Vol 23, p 452-476, Academic Press New York.
- Sumner, J.B. (1921):** Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *J. Biol. Chem.*, **47**: 5-9.
- Suvachittanont, W., Peutpaiboon, A. (1992):** Lectin from *Parkia speciosa* seeds. *Phytochem.* **31**: 4065-4070.
- Tschermak, E. (1941):** Untersuchungen über die Beziehungen von Pilz und Alge in den Flechten. *Ost. Bot. Ges.*, **90**: 234-307.
- Umekawa, H., Kondoh, K., Furuichi, Y., Takahashi, T., Yoshida, S. (1992):** DNA polymerase α , β and activities in human lymphocytes stimulated by Tora-mame (*Phaseolus vulgaris*) lectin. *Biochem. Int.* **28**: 1063-1070.
- Vartia, K.O. (1973):** Antibiotics in lichens. En *The Lichens* (Ahmadjian, V., Hale, M.E., eds), p. 547-561. Academic Press, New York (1973).
- Viard, B., Mahmood, S.A., Streiblova, E., Bonaly, R. (1993):** Alternative interactions of the D-galactose-specific yeast lectin Kb-CwL I with sensitive yeast strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, **107**: 17-24.

- Vicente, C. (1985):** Surface physiology of lichens: facts and concepts. En *Surface Physiology of Lichens* (Vicente, C., Brown, D.H., Legaz, M.E., eds.), p. 11-24. Editorial Universidad Complutense, Madrid.
- Vicente, C., Legaz, M.E. (1981):** Purification and properties of L-arginine decarboxylase of *Evernia prunastri*. *Plant & Cell Physiol.*, **22**: 1119-1123.
- Vicente, C., Legaz, M.E. (1982):** Purification and properties of agmatine amidinohydrolase of *Evernia prunastri*. *Physiol. Plant.*, **55**: 335-339.
- Vicente, C., Legaz, M.E. (1983):** Regulation of urea production in *Evernia prunastri*: effects of L-arginine metabolites. *Z. Pflanzenphysiol.*, **111**: 123-131.
- Vicente, C., Legaz, M.E. (1988):** Lichen enzymology. En *Handbook of Lichenology* (Galun, M., ed.), Vol. I, p. 239-281. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Vicente, C., Pérez-Urria, E. (1988):** Tolbutamide, a urea derivative, impedes phenolic accumulation in the lichen *Evernia prunastri*. *J. Plant Physiol.*, **132**: 580-583.
- Vicente, C., Pérez-Urria, E. (1989):** Production and secretion of urease by *Evernia prunastri* thallus and its symbionts. *Endocyt. Cell Res.*, **6**: 87-97.
- Vicente, C., Xavier Filho, L. (1979):** Urease regulation in *Cladonia verticillaris*. *Phyton (BA)*, **37**: 137-144.
- Vicente, C., Nieto, J.M., Legaz, M.E. (1983):** Induction of urease by urea analogues in *Evernia prunastri* thallus. *Physiol. Plant.*, **58**: 325-330.
- Vicente, C., Mateos, J.L., Pedrosa, M.M., Legaz, M.E. (1991):** High-performance liquid chromatographic determination of sugars and polyols in extracts on lichens and sugarcane juice. *J Chromatogr.*, **553**: 271-283.
- Vicente, C., Avalos, A., Legaz, L.E., Pérez-Urria, E., Divassón, A. (1988):** Water relations of *Evernia prunastri* thalli in natural environments: evidences about a metabolic control of water loss. *Plant Physiol. (Life Sci. Adv.)*, **7**: 119-124, 1988.
- Wantyghem, J., Platzeu, N., Giner, M., Derappe, C., Goussault, Y. (1992):** Structural analysis of the carbohydrate chain of glycopeptides isolated from *Robinia pseudoacacia*. *Carbohydr. Res.*, **236**: 187-193.
- Ward, H.M. (1888):** A lily disease. *Ann. Bot.*, **2**: 319-382.
- Weiss, R.L., Davis, R.H. (1973):** Intracellular localization of enzymes of arginase metabolism in *Neurospora*. *J. Biol. Chem.*, **248**: 5403-5408.
- Weiss, R.L., Davis, R.H. (1977):** Control of arginine utilization in *Neurospora*. *J. Bacteriol.*, **129**: 866-873.

- Wessels, D., Kappen, L. (1993): Photosynthetic performance of rock-colonising lichen in the Mountain Zebra National Park. *Koedoe*, **36**: 27-48.
- West, H.M., Walters, D.R. (1988): The effects of polyamine biosynthesis inhibitors on infection of *Hordeum vulgare* by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *New Phytol.*, **110**: 193-200.
- West, H.M., Walters, D.R. (1989): Effects of polyamine biosynthesis inhibitors on growth of *Pyrenospora teres*, *Gaeumannomyces graminis*, *fusarium culmorum* and *Septoria nodorum* in vitro. *Mycol. Res.* **92**: 453-457.
- Yagi, F., Imade, T., Tadera, K. (1990): Immunological properties of lectins from green shells of winged bean, and N-terminal amino acid sequence of basic seed lectin-like green shell lectin. *Agr. Biol. Chem.*, **54**: 551-553.
- Yagi, F., Noguchi, S., Suzuki, S., Tadera, K., Goldstein, I.J. (1993) Purification and characterization of isolectins from *Lycoris aurea*. *Plant Cell Physiol.* **34**: 1267-1274.
- Yagi, F., Sawada, R., Imade, T., Toyonaga, S., Tadera, K. Ishihata, K. (1994): Two isolectins from leaves of winged bean, *Psophocarpus tetragonobolus*. *Plant Cell Physiol.*, **35**: 1087-1095.
- Yamaguchi, O., Kimura, M., Araki, M., Yamasaki, N., Kimura, Y., Nakajima, S., Takagi, S. (1993): Chemical structures of two subunits, A-subunit and B-subunit, of galactose-specific isolectins from *Erythrina variegata* seeds. *J. Biochem.*, **114**: 560-566.
- Yamashita, K., Ohkura, T., Umetsu, K., Suzuki, T. (1992). Purification and characterization of a Fuc α 1-2Gal β 1- and GalNAc β 1-specific lectin in root tubers of *Trichosanthes japonica*. *J. Biol. Chem.* **267**: 25414-25422.
- Yokose, S., Tahiwai, Y., Ohua, J., Seki, T., Utsumi, N. (1991): Light and electron microscopic demonstration of wheat germ agglutinin binding in the pericellular matrix of rat mandibular condylar cartilage. *Arch. Oral Biol.*, **36**: 401-404.
- Yoshida, M., Kato, S., Oguri, S., Nagata, Y. (1994): Purification and properties of lectins from a mushroom, *Pleurotus cornucopiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**: 498-501.
- Young, N.M., Oomen, R.P. (1992): Analysis of sequence variation among legume lectins. A ring of hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site. *J. Mol. Biol.*, **228**: 924-934.
- Zook, D.P. (1983): *A study of the role of bacteria in lichens*. Master of Arts Thesis, Clark University, Worcester.